

C型肝炎ウイルス非構造蛋白質のチロシンリン酸化とそのウイルス 宿主間相互作用における重要性

研究代表者： 竹内 健司 (医学部・学内講師)

共同研究者： 千原 一泰 (医学部・准教授)、 定 清直 (医学部・教授)

概 要
C型肝炎慢性肝炎の合併症としてクリオグロブリン血症やB細胞リンパ腫があるが、これらの発症機構はわかっていない。本研究では、起因ウイルスであるC型肝炎ウイルス(HCV)の非構造蛋白質NS5AがB細胞に及ぼす影響を探った。その結果、NS5AはB細胞においてSrcファミリーキナーゼFynと会合しその酵素活性を亢進させていることが示された。両者の会合はNS5Aのチロシンリン酸化を介して起こっているように思われた。この会合のウイルス学的意義は未解明だが、B細胞のシグナル伝達に介入することによって宿主のHCVに対する獲得免疫応答を修飾し、感染宿主内での持続感染を可能にしていることなどが考えられる。C型肝炎慢性肝炎に合併するB細胞性疾患はこのような介入の結果起こる副反応としてとらえることができるかもしれない。
関連キーワード
C型肝炎ウイルス、B細胞、シグナル伝達、チロシンリン酸化、チロシンキナーゼ

研究の背景および目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は専らヒトの肝細胞を増殖の場とし、ウイルスキャリアに慢性肝炎・肝硬変・肝細胞癌を引き起こすが、合併症として混合型クリオグロブリン血症やB細胞リンパ腫を引き起こすことも知られている。これら合併症の発症機構は不明だが、HCVはB細胞にも侵入し、ウイルス増殖までには至らないものの、細胞内でウイルスゲノムの複製が起こることがわかっており、このことがHCVのB細胞に対する病原性の前提になっていると考えられる。

HCVはエンベロープ陽性のRNAウイルスでそのゲノムはわずか10種類ほどの蛋白質をコードする。ゲノムRNAの5'側にはウイルス粒子の構成成分である構造蛋白質が、3'側にはウイルス粒子構成成分とはならない非構造蛋白質がコードされている。非構造蛋白質にはプロテアーゼやRNAポリメラーゼなどがあり、これらがウイルス蛋白質の成熟やウイルスゲノムの複製を担う。非構造蛋白質NS5Aは酵素活性を持たないが様々な宿主蛋白質と相互作用することが知られており、その相互作用を介してウイルス増殖に関わっていると考えられている。このとき、NS5Aが感染細胞の生理機能に影響を及ぼす可能性がある。そこで、本研究ではNS5Aを安定発現するB細胞株を樹立し、その性状を解析することにした。

B細胞表面のB細胞レセプターが抗原刺激によって活性化されると、応答したB細胞の分化・増殖・細胞死などが起こる。抗原刺激の細胞内シグナル伝達は蛋白質のチロシンリン酸化などを介し

て進行するが、一般的に、蛋白質のチロシンリン酸化は、これを担うチロシンキナーゼを含め、様々なシグナル伝達因子の活性を緻密に制御する手段となっている。

例えば、Src、Fyn、LynなどのSrcファミリーキナーゼ(SFK)がB細胞の抗原刺激で活性化するが、これらSFKが活性化するには酵素活性ドメインであるSrcホモロジー(SH)1ドメイン中にある活性化ループのチロシン残基がリン酸化される必要がある。一方、SH1ドメインではなくC末端ドメインにあるチロシン残基がリン酸化されると、SFK中にあるSH2ドメインがこのリン酸化チロシンに結合、この分子内結合がSH1活性化ループのSFK立体構造中への埋没を引き起こし、SFKの活性化が阻害される。しかし、SFK中にあるSH3ドメインのガイドによりSH2ドメインが他のチロシンリン酸化蛋白質と結合すると、SH2ドメインから解放されたC末端リン酸化チロシンの脱リン酸化や分子表面に露出した活性化ループのチロシンリン酸化が可能となる。なお、SFKなどの蛋白質のSH2ドメインはリン酸化チロシン残基のみを認識しているのではなく、リン酸化チロシン近傍のアミノ酸配列も特異的に認識している。このため、個々の蛋白質のSH2ドメインはそれぞれ異なるリガンド特異性を示す。

本研究では、まず、HCVのNS5Aがチロシンリン酸化蛋白質であるという仮説を立ててこれを確認、次に、チロシンリン酸化NS5Aに結合するSH2ドメインの検索を試みた。

研究の内容および成果

結果 (1) NS5A のチロシンリン酸化：一般に、細胞内蛋白質のチロシンリン酸化レベルはチロシンキナーゼとチロシンフォスファターゼ両者の活性のバランスによって平衡状態を保っている。このため、細胞をチロシンフォスファターゼの非特異的阻害剤である過バナジル酸 (Pervanadate : PV) で処理すると、様々な蛋白質の速やかなチロシンリン酸化が観察できる。NS5A を安定発現する BJAB 細胞 (ヒト B 細胞由来) を PV で処理したところ、リン酸化チロシン特異抗体を用いたウェスタンブロット法により、NS5A のチロシンリン酸化が認められた。

結果 (2) NS5A と結合する SH2 ドメインの検索：Lyn、Fyn、Syk などの宿主蛋白質に由来する SH2 ドメインと GST の融合蛋白質を調製し、これらを釣り針に PV 処理した B 細胞内で発現していた NS5A のプルダウンアッセイを行った。Lyn や Syk などの SH2 には NS5A 結合能が認められなかったのに対し、Fyn の SH2 は NS5A と強く結合した。この結合は NS5A 発現 B 細胞の PV 処理によって強まるものであった。また、Fyn の SH3 にも NS5A 結合能が認められた。

結果 (3) NS5A による Fyn の活性化：抗原刺激により B 細胞内の Fyn は速やかに活性化するが、刺激がない場合、その活性は低く抑えられている。ところが、NS5A 発現 B 細胞では Fyn の活性化ループ上にあるチロシン残基のリン酸化レベルが構成的に亢進していた (図 1A)。実際、試験管内チロシンキナーゼアッセイをしたところ、NS5A 発現 B 細胞から調製した Fyn の比活性が上昇しているのを確認できた (図 1B)。さらに、NS5A 発現 B 細胞の B 細胞レセプターを抗 IgM 抗体で刺激したところ、刺激に応じた Fyn 活性化ループのチロシンリン酸化が観察された (図 1A)。従って、NS5A の発現は抗原刺激に対する B 細胞の応答能そのものを損なうわけではないと思われた。

結果 (4) チロシンリン酸化部位の同定：本研究では HCV Con1 株に由来する NS5A を用いたが、これには合計 10 個のチロシン残基がある。このうち他の株でも保存されているチロシン残基は 8 つで、この 8 つのうちいずれか一つをフェニルアラニンに置換した変異蛋白質の cDNA を作成し、

Cos-7 細胞で発現、細胞を PV 処理したのち溶解し、変異蛋白質のチロシンリン酸化レベルをウェスタンブロット法によって検討した。その結果、334 番のチロシン残基が主なリン酸化部位であることが示唆された。

考察：以上、B 細胞で発現した HCV の NS5A 蛋白質はチロシンリン酸化を介して Fyn と会合し、Fyn の酵素活性を亢進させていることが示された。そのウイルス学的意義はまだ解明できていないが、B 細胞内で起こるシグナル伝達に HCV が介入することによって HCV に対する宿主の獲得免疫応答を修飾し、感染宿主内でのウイルス持続感染を可能にしていることなどが考えられる。HCV による B 細胞性疾患の発症はこのような介入の結果起こる副反応としてとらえることができるかもしれない。

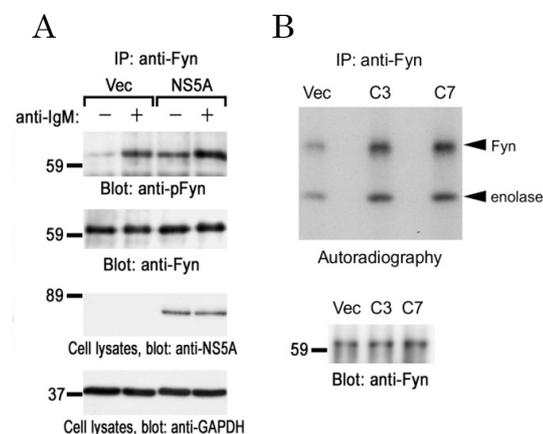


図 1. A : B 細胞における Fyn 活性化ループチロシン残基のリン酸化に及ぼす HCV NS5A 蛋白質発現の効果 (部位特異的リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロット法による)。B : 試験管内チロシンキナーゼアッセイ。C3、C7 は NS5A 発現 B 細胞クローン 2 つでの結果を示す。「vec」はコントロール細胞。「矢尻 Fyn」は自己リン酸化反応のレベルを、「矢尻 enolase」は反応液中に加えた基質のチロシンリン酸化レベルを示す。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, Horiguchi T, Sun X, Deng L, Shoji I, Hotta H, Sada K. HCV NS5A protein containing potential ligands for both Src homology 2 and 3 domains enhances autophosphorylation of Src family kinase Fyn in B cells. *PLoS One*. 2012; 7(10): e46634.

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科研費補助金 (基盤 C (一般)) 「C 型肝炎ウイルスによる B 細胞蛋白質チロシンリン酸化への影響」 (分担)、H22-24 年度 (採択)
 科研費補助金 (基盤 C (一般)) 「RNA ウイルスの感染におけるウイルス蛋白質チロシンリン酸化」 (代表)、H25-27 年度 (申請中)