

抗がん剤イマチニブはC型肝炎の治療薬となりうるか。

研究代表者： 山内 翔太（医学部・特命助教）
共同研究者： 定 清直（医学部・教授）、千原 一泰（医学部・准教授）、
竹内 健司（医学部・学内講師）

概 要	C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus: HCV) は肝細胞への侵入後、ウイルス RNA の複製とウイルスタンパク質の合成を繰り返し、これらを部品としてウイルス粒子を形成する。ウイルス粒子は肝細胞の分泌機構を介して放出され、別の肝細胞に感染する。ウイルス RNA の複製とウイルス粒子の形成には、ウイルスタンパク質 NS5A のリン酸化が重要であるとされているが、このリン酸化に関与するキナーゼはほとんどわかっていない。本研究では、HCV の粒子産生におけるチロシンキナーゼ c-Abl の役割を調べた。HCV の粒子産生は c-Abl のノックダウンにより抑制された。また、c-Abl は in vitro で NS5A の 330 番目のチロシン残基をリン酸化し、このチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異型ウイルスでは、ウイルス粒子の形成が顕著に減弱していた。これらの結果は HCV の粒子形成には c-Abl による NS5A のリン酸化が必要であることを示唆する。
関連キーワード	ウイルス粒子形成、宿主ウイルス相互作用、チロシンリン酸化

研究の背景および目的

HCV は 3 種類の構造タンパク質と 7 種類の非構造タンパク質を有する RNA ウイルスである。構造タンパク質がウイルス RNA とともにウイルス粒子の一部をなすのに対し、非構造タンパク質は宿主の肝細胞タンパク質を利用することで、ウイルス RNA の複製やウイルス粒子の形成を担う。

非構造タンパク質 NS5A は、ウイルス RNA の複製とウイルス粒子の形成の両方に必要なリン酸化タンパク質である。低リン酸化型(p56)の NS5A はウイルス RNA の複製を、高リン酸化型(p58)の NS5A はウイルス粒子の形成をそれぞれ促進するとされる。NS5A をリン酸化するキナーゼの一つとして、セリン/スレオニンキナーゼであるカゼインキナーゼが同定されている。これに加え、我々は、NS5A が未同定のチロシンキナーゼにリン酸化されることを報告している(Nakashima, K. *et al.*, *PLoS ONE*, 2012)。また、NS5A は Src、Fyn、

Syk、c-Abl といったチロシンキナーゼと会合することが報告されている(Macdonald, A. *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 2004; Inubushi, S. *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 2008; Nakashima, K. *et al.*, *PLoS ONE*, 2012)。しかしながら、HCV のライフサイクルにおけるチロシンキナーゼの役割はほとんど解明されておらず、上皮増殖因子受容体(EGFR)のキナーゼ活性が、HCV の細胞内への侵入に必要であることが、最近報告された程度である(Lupberger, J. *et al.*, *Nat. Med.*, 2011; Zona, L. *et al.*, *Cell Host Microbe*, 2013)。

Abl ファミリーキナーゼは、コクサッキーB ウイルス、ワクチニアウイルス、エボラウイルスなどの細胞内への侵入や細胞外への放出に関わることが知られている。本研究では、HCV のライフサイクルにおける Abl ファミリーキナーゼの役割を明らかにすることを目的とした。

研究の内容および成果

Abl 阻害剤イマチニブが HCV の感染拡大を阻害することが、培養細胞を用いたスクリーニングによって既に示されている。イマチニブが HCV のライフサイクルのどの過程を抑制するのかを調べるために、Huh-7.5 細胞を HCV(J6/JFH1 株)に感染させ、イマチニブ存在下で培養した。細胞内外のウイルス粒子を回収し、フォーカス形成アッセイにより定量した。イマチニブ処理により細胞内外ともにウイルスタイターが約 80%低下していた。一方、ウイルス RNA の複製や細胞の生存率には顕

著な影響が見られなかった。これらの結果はイマチニブ処理がウイルス粒子の形成を抑制することを示唆している。

イマチニブは、Abl ファミリーに属する c-Abl と Arg に加えて、いくつかのチロシンキナーゼの活性を阻害することが知られている。c-Abl または Arg が HCV の粒子形成に必要であるかを検討するために、c-Abl と Arg が常時ノックダウンされた Huh-7.5 細胞を作成し、HCV に感染させた。イマチニブ処理と同様、c-Abl のノックダウンにより細

胞内外のウイルスタイターが低下したが（図 1）、ウイルス RNA の量に変化は見られなかった。一方、Arg のノックダウンはウイルスタイターに顕著な影響を与えなかった。これらの結果は c-Abl がウイルス粒子の形成に関わることを示唆している。

我々は過去に c-Abl の SH3 ドメインが *in vitro* で NS5A と結合すること、過剰発現させた NS5A が pervanadate（チロシンホスファターゼ阻害剤）処理によりチロシンリン酸化されることを報告している。そこで、c-Abl がウイルス粒子形成を促進するために、NS5A をリン酸化する可能性を検討した。HCV に感染させた Huh-7.5 細胞において、NS5A はチロシンリン酸化され、c-Abl のノックダウンによりこのリン酸化が抑制された。また、Con1 株の NS5A を COS7 細胞において c-Abl と共発現させると、チロシンリン酸化された。c-Abl によるリン酸化部位を特定するために、Con1 株と JFH1 株が共通して持つチロシン残基を Con1 株 NS5A においてフェニルアラニンに置換した。8 個の変異の内 Y334F 変異が COS7 細胞における NS5A のチロシンリン酸化を抑制した。また、c-Abl は *in vitro* で JFH1 株 NS5A の Y330（Con1 株の Y334 に相当）をリン酸化した。これらの結果は NS5A が c-Abl の基質であることを示唆している。

NS5A の Y330 が HCV の粒子形成に必要であるかを調べるために、HCV のゲノム RNA に NS5A Y330F 変異を導入した。この変異型ウイルスでは細胞内外のウイルスタイターが 90%以上低下していた。一方、NS5A Y330F 変異を持つサブジェノミックレプリコンは野生型と同様の複製能を示した。これらの結果は NS5A Y330 がウイルス粒子形成に関わることを示唆している。

NS5A は Core タンパク質依存的にリピッドドロブレットに局在し、HCV の粒子形成を促進する。

そこで、c-Abl による NS5A のリン酸化が NS5A の細胞内局在に影響を与える可能性を検討した。c-Abl ノックダウン細胞において、NS5A はコントロール細胞内と同様にリピッドドロブレットに局在していた。また、NS5A Y330F 変異を導入したウイルスにおいても、NS5A のリピッドドロブレットへの局在に目立った変化は見られなかった。したがって、c-Abl は NS5A のリピッドドロブレットへの局在には不要と考えられる。

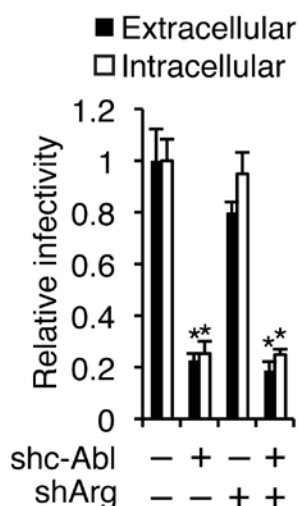


図 1. c-Abl ノックダウンによるウイルス粒子形成の抑制。Huh-7.5 細胞において c-Abl と Arg をショートヘアピン (sh) RNA を用いて、ノックダウンし、HCV 感染 48 時間後、細胞内外のウイルスタイターを定量した。

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」

The c-Abl Tyrosine Kinase Promotes Hepatitis C Virus Particle Assembly by Phosphorylating NS5A
Shota Yamauchi, Kenji Takeuchi, Kazuyasu Chihara, Xuedong Sun, Chisato Honjoh, Hatsumi Yoshiki, Hak Hotta, Kiyonao Sada
投稿予定

「特記事項」

なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科研費補助金・若手 (B)・H27~28・「ウイルスタンパク質のチロシンリン酸化に着目した C 型肝炎ウイルス増殖機構の解析」・代表・申請中