

非受容体型チロシンキナーゼ Abl と C 型肝炎ウイルスの相互作用

研究代表者： 竹内 健司 (医学系部門・助教)

共同研究者： 千原 一泰 (医学系部門・准教授)、藤枝 重治 (医学系部門・教授)、定 清直 (医学系部門・教授)

概 要	ウイルスは宿主の様々な因子に依存して増殖する。Abl はアクチン重合などに関わる非受容体型チロシンキナーゼである。最近、我々は、短鎖ヘアピン RNA を用いた Abl 発現のノックダウンまたは Abl 阻害剤イマチニブ処理により C 型肝炎ウイルス (HCV) の増殖がウイルス産生のステップで抑制されること、Abl は HCV の非構造蛋白質の一つである NS5A の特定チロシン残基をリン酸化することによってウイルス産生を促進していることを示唆している。本研究では、その分子機構をより詳細に明らかにするため、まず、Abl 遺伝子をノックアウト (KO) した培養肝細胞株を樹立し、その KO 細胞株に Abl cDNA を導入して Abl 発現復帰細胞株を樹立した。これらに HCV を接種したところ、Abl 発現の有無によってウイルス産生能が有意に変動するのを観察した。次に、293T 細胞での Abl-NS5A 共発現実験を行ったところ、NS5A は Abl の基質であるだけでなく、Abl 活性化因子としても機能すること、また、両者がチロシンリン酸化を介して複合体を形成することが示唆された。
関連キーワード	C 型肝炎ウイルス、ウイルス-宿主相互作用、チロシンキナーゼ、Abl

研究の背景および目的

ウイルスは宿主細胞の様々な因子に依存して増殖する。従って、ウイルス蛋白質を標的とする抗ウイルス薬のみならず、こういった宿主因子の阻害剤もウイルス感染症治療薬の候補となり得る。

Abl はアクチン重合などに関わる非受容体型チロシンキナーゼである。通常 Abl は不活性な立体構造で細胞内に存在しているが、細胞内外で生じた活性化シグナルを受け取ると特定チロシン残基がリン酸化するとともにその立体構造が変化することによって高いキナーゼ活性を表すと考えられている。慢性骨髄性白血病などでは染色体転座により活性型の BCR-Abl 融合蛋白質が異常発現しており、イマチニブなどの Abl 阻害剤が治療に用いられる。この Abl をウイルス産生のステップで利用しているものとしてポックスウイルスとエボラウイルスが知られており、Abl 阻害剤をこれらウイルスによる感染症の治療薬として転用する可能性が論じられている。

C 型肝炎ウイルス (HCV) は急性/慢性 C 型肝炎の病原体であり、肝硬変や肝細胞癌の原因となる。ウイルス粒子は宿主細胞の ER 膜に由来するエンベロープ膜を有し、その内側にはコア蛋白質に包まれたゲノム RNA が格納されている。

最近、我々は、短鎖ヘアピン RNA を用いた Abl 発現のノックダウンまたは細胞のイマチニブ処理により HCV の増殖がウイルス産生のステップで抑制されることを見出した (参考文献)。Abl は HCV の非構造蛋白質の一つである NS5A の特定チロシン残基をリン酸化することによってウイルス産生を促進しているように思われた。

本研究では、Abl による HCV 増殖促進の分子機構をより詳細に明らかにすることを目的として、1) Abl 遺伝子をノックアウト (KO) した培養肝細胞株を樹立しその HCV 産生能を検討するとともに、2) Abl と NS5A の相互作用を検討する。

研究の内容および成果

【方法】

Abl-KO 培養肝細胞株の樹立と Abl 発現復帰細胞株の樹立: ヒト肝細胞癌由来培養細胞株 Huh7.5 を CRISPR/Cas9 法でゲノム編集することによって Abl-KO 細胞クローンを樹立した。Abl 遺伝子のエクソン 2 内の塩基配列を標的とするガイド RNA とガイド RNA 依存性 DNA 切断酵素 Cas9 を発現するプラスミド並びにネオマイシン耐性プラスミドを Huh7.5 細胞にトランスフェクト、G418 耐性

細胞クローン複数を得た。そして、抗 Abl 抗体を一次抗体とするウェスタンブロット (WB) 法で Abl 蛋白質が検出されない細胞株を選択、これらのゲノム DNA を抽出し、Abl 遺伝子エクソン 2 を含む領域の塩基配列を決定して Abl-KO 変異が施されていることを確認した。次に、動物細胞用発現プラスミドに Abl cDNA を挿入したプラスミド DNA に対し、前記ゲノム編集標的配列内に 2 つの同義変異を施した。このプラスミドとプラスチサ

イジン耐性プラスミドを Abl-KO 細胞株にトランスフェクト、プラスチサイン耐性細胞クローン複数を取得し、この中から WB 法で Abl の発現が十分認められるものを Abl 発現復帰細胞株とした。

培養細胞株の HCV 産生能の検定: 前記変異細胞株と親細胞に MOI~10 [PFU/cell] 前後の量の HCV (J6/JFH1 キメラ株の Huh7.5 細胞を用いた継代株) を接種、3 日後に培養上清を回収した。これは細胞外に放出されたウイルス粒子を含む。同時に、感染細胞に精製水を加え 3 度凍結融解して細胞を破碎、遠心上清を回収した。この上清は細胞内膜中に放出されたがまだ細胞外に放出されていないウイルス粒子を含む。その後、これら 2 種類の上清の希釈系列を 96 穴マルチウェルプレート上に生やした Huh7.5 細胞の培養液中に加え、3 日後固定、抗 HCV コア抗体を一次抗体として用いた蛍光抗体法でウイルスコア蛋白質を検出、Behrens-Karber 法で TCID50 (Median tissue culture infectious dose) を計算し、ウイルス力価とした。

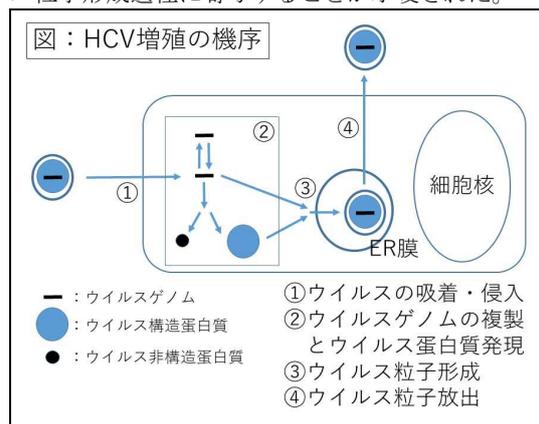
【結果と考察】

1. HCV の増殖に対する Abl 発現の影響

CRISPR/Cas9 法によって Abl-KO Huh7.5 細胞 3 株 (KO1, 2, 3) を樹立した。これら 3 株並びに親細胞に HCV を接種し、細胞外/細胞内の感染性ウイルス量を比較した。その結果、KO1 と KO2 のウイルス産生能は細胞外/細胞内ウイルスともに親細胞と比べ、10 分の 1 ほどに低下しており、有意差が認められた。他方、KO3 株でのウイルス産生量は、細胞外ウイルスに関しては有意に低下していたが、細胞内ウイルスに関しては有意差が認められない程度の低下であった。次に、KO1 株に Abl cDNA をトランスフェクトし、親細胞と比べて遜色のないレベルの Abl 蛋白質の発現がみられる細胞 2 株 (KO1-R1, R2) を樹立した。これら Abl 発現復帰細胞 2 株のウイルス産生能を検査したところ、KO1 株と比べ、細胞内・細胞外ウイルスともに 10 倍ほど産生量が増えた (有意差有)。このことから、Abl 遺伝子を標的としたゲノム編集が Huh7.5 細胞のウイルス産生能に及ぼす影響は、CRISPR/Cas9 法でしばしば問題となるガイド RNA の off-target 効果によるものではないと思われる。

また、我々は、ウイルス感染細胞内のウイルス非構造蛋白質 NS3 の発現レベルを WB 法で検討し

ている。親細胞株と Abl-KO 細胞株・Abl 発現復帰細胞の間で蛋白質発現レベルの違いはなかった。つまり、Abl 発現の有無はウイルス蛋白質の蓄積量に影響していなかったことから、下図にある HCV 増殖の①から④までのステップのうち、ステップ②まではうまくいっていることが示唆された。一方、親細胞/KO1/KO1-R の系列で感染細胞内外のウイルス量が Abl 発現の有無によって同程度に変動したことから、Abl はステップ③、すなわち、ウイルス粒子形成過程に寄与することが示唆された。



2. Abl-NS5A 相互作用の検討

Abl とウイルス非構造蛋白質 NS5A との相互作用を検討するため、293T 細胞で両者を cDNA から共発現させ、WB でチロシンリン酸化した両蛋白質の検出を行った。すると、共発現により NS5A がチロシンリン酸化されるだけでなく、Abl 分子中 Abl 活性化の指標である Y412 位がチロシンリン酸化したものが増えることが判った。同時に、Abl が NS5A とともに免疫共沈するのが認められた。Abl のキナーゼ活性を消失させる変異、或いは、NS5A のチロシンリン酸化部位のアミノ酸変異により、免疫共沈の程度は低下した。これらの結果より、NS5A は Abl の基質となるだけでなく、活性化因子としても機能すること、また、チロシンリン酸化を介して両者が複合体を形成することが示唆された。

【参考文献】

Yamauchi S, Takeuchi K, Chihara K, et al. Hepatitis C Virus Particle Assembly Involves Phosphorylation of NS5A by the c-Abl Tyrosine Kinase. *J Biol Chem.* 2015;290(36):21857-64.

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」

・宮本大輔、竹内健司、千原一泰、定清直「非受容体型チロシンキナーゼ Abl と C 型肝炎ウイルスの相互作用」3LBA-064 第 42 回日本分子生物学会年会・福岡 (2019 年 12 月)

「特記事項」

本助成は大学院生の博士論文研究に使われた。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

・科研費・基盤 (C) (一般) H29-R 元年度「ウイルス感染宿主因子としてのチロシンキナーゼ Abl の新しい役割」分担・受入中
 ・科研費・基盤 (C) (一般) R2-4 年度「二重鎖 RNA ストレスからの回復における二重鎖 RNA 処理機構の解明」代表・申請中