

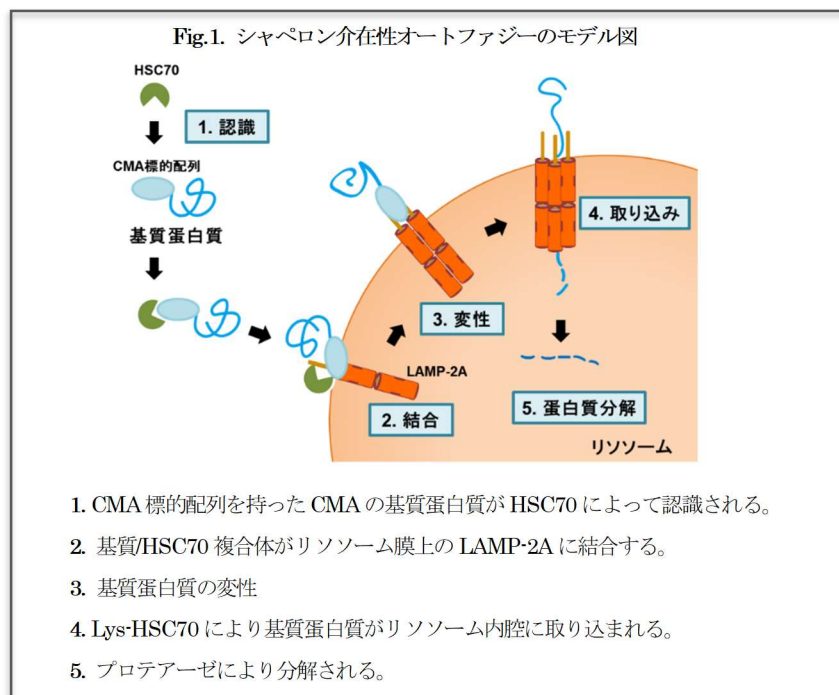
「HCV 感染における転写因子の蛋白質分解を介した病態への影響」

神戸大学大学院医学研究科附属感染症センター 感染制御学分野

松井 千絵子

1 研究の背景と目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌などの肝内病変だけでなく、糖代謝異常や脂質代謝異常、鉄代謝異常など多彩な肝外病変を引き起こす。これまでの研究において、HCV感染がグルコース輸送体2(GLUT2)の細胞表面発現の低下を通じて、肝細胞のグルコース取り込みを抑制したことを報告している。さらに、HCV NS5A蛋白質が細胞内シャペロン蛋白質 HSC70 と相互作用し、シャペロン介在性オートファジー(**Chaperone-mediated autophagy: CMA**)を介して、細胞内転写因子 HNF-1 α の蛋白質分解を誘導することが、GLUT2 プロモーター活性の抑制につながることを報告した。シャペロン介在性オートファジーは、選択的オートファジー分解である。5つのアミノ酸配列である CMA 標的配列を細胞内の HSC70 が認識し、リソソームへ輸送し、リソソーム膜上の LAMP-2A 蛋白質を介してリソソーム内に基質蛋白質を取り込み、リソソーム酵素で蛋白質分解を誘導する(Fig.1)。



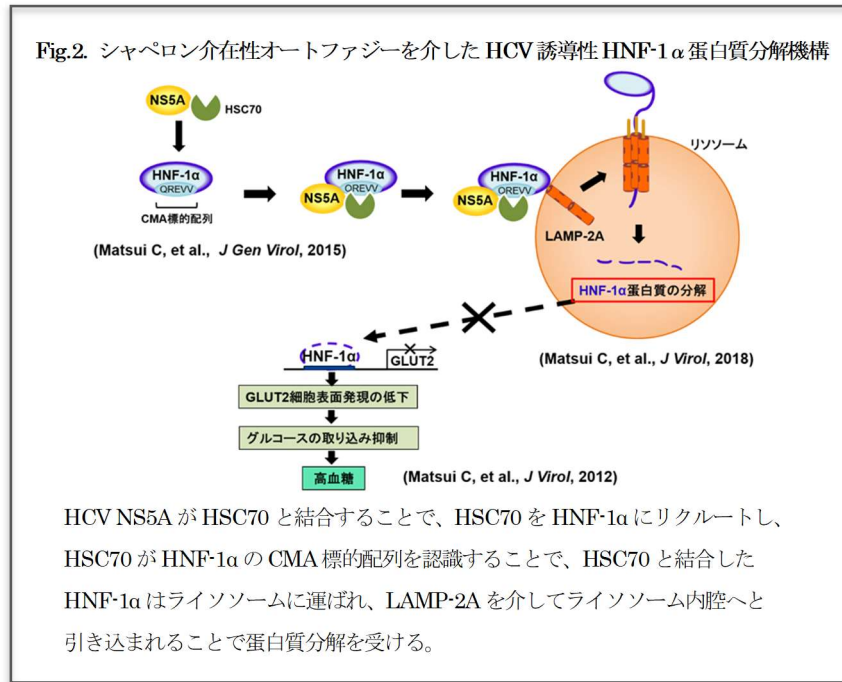
HCV 感染による HNF-1 α 蛋白質量の減少は、HNF-1 α が関与する下流の因子に影響を及ぼす可能性が考えられる。HNF-1 α は転写因子として GLUT2 をはじめとした糖代謝異常や脂質代謝異常などの、様々な代謝関連遺伝子の転写調節に関与することが知られている。その中でも脂肪酸結合因子 1(FABP1)は、遊離脂肪酸と結合して遊離脂肪酸の細胞内輸送に関わることが知られている。本研究では HCV 感染によるシャペロン介在性オートファジーを介した HNF-1 α 蛋白質の分解が、FABP1 のプロモーター活性を低下させ、FABP1 遺伝子発現抑制を引き起こし脂肪酸輸送に異常をきたすかを検討することを目的とした。さらには HCV 感染におけるシャペロン介在性オートファジーの病態生理学的意義を解明することにつながる。

2 研究方法・研究内容

(1) HCV 感染による HNF-1α 蛋白質分解が FABP1 発現に影響を及ぼすかを検討した。

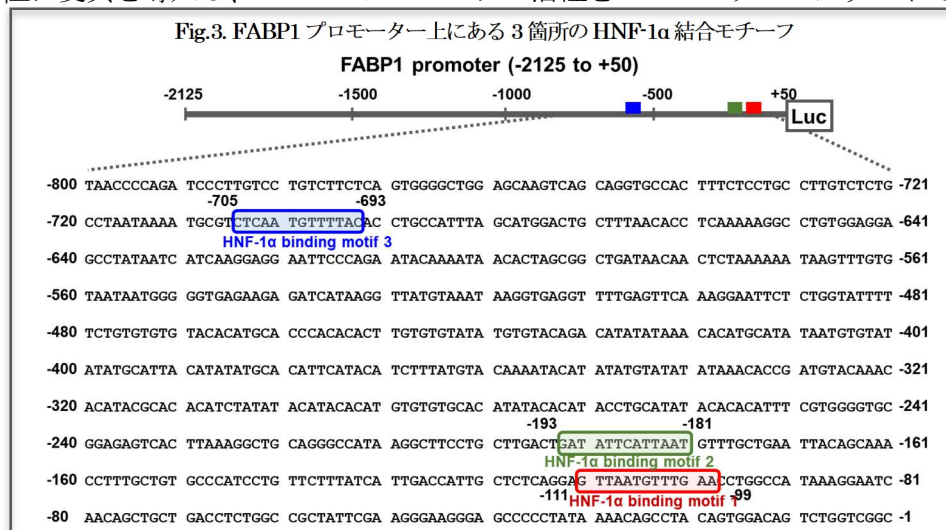
HCV 感染によりシャペロン介在性オートファジーを介して HNF-1α 蛋白質分解が引き起こされることをすでに報告している(Fig.2)。HCV 感染による HNF-1α 蛋白質量の減少が、HNF-1α の下流因子である FABP1 の発現に影響を及ぼすかを調べるため、HCV 感染させた細胞における FABP1 蛋白質量変化を western blotting で確認した。

さらに HCV 感染による FABP1 蛋白質量の減少は、シャペロン介在性オートファジーを介した HCV 感染による HNF-1α 蛋白質量の減少によるものであるかを調べるため、シャペロン介在性オートファジーに関わる重要な受容体である LAMP-2A をノックダウンした。



(2) HNF-1α による FABP1 プロモーター活性への影響を検討した。

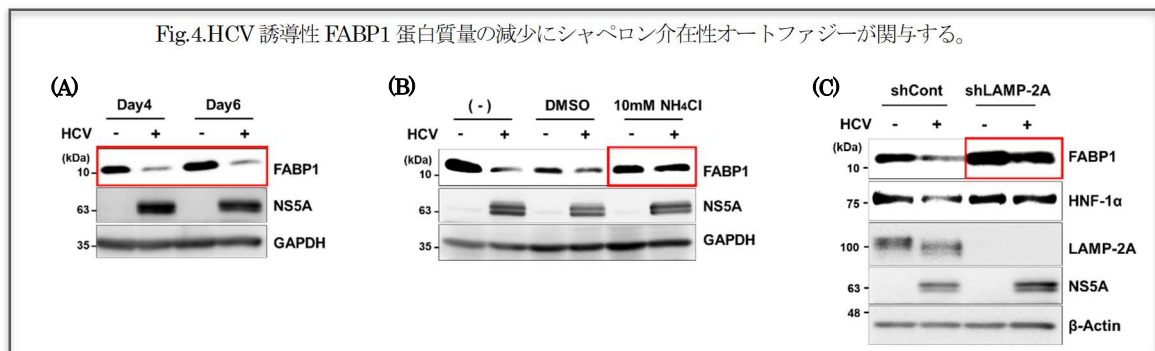
FABP1 の転写因子として HNF-1α が知られている (Akiyama T et al., Biol Chem., 2000)。Eukaryotic promoter database (EPD)を用いて予想される FABP1 プロモーター上の HNF-1α 結合部位を調べたところ、3箇所あることがわかった(Fig.3)。3箇所のうち、どの結合部位が FABP1 プロモーター活性に重要であるのかを検討するため、各予想される HNF-1α 結合部位に変異を導入し、FABP1 プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイで調べた。



3 研究成果

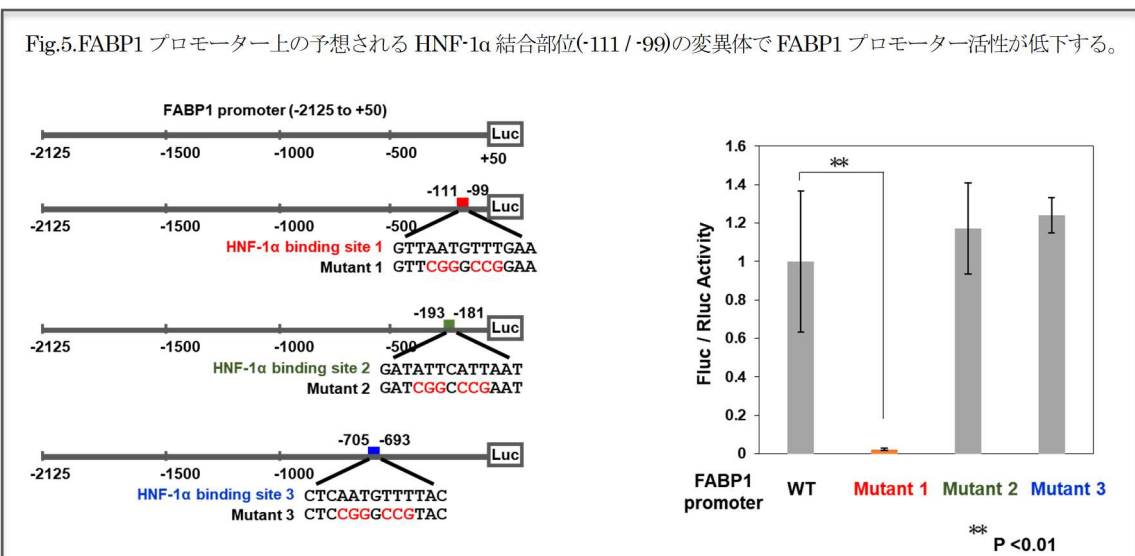
(1) HCV 感染により FABP1 蛋白質発現量が減少した。

HCV 感染させた細胞における FABP1 蛋白質量変化を確認するため、western blotting を行い、抗 FABP1 抗体で確認した。その結果、HCV 感染 4 日目、6 日目のいずれにおいても FABP1 蛋白質の著しい低下が見られた(Fig.4A)。HCV 感染誘導性 FABP1 蛋白質量の減少は、オートファジー阻害剤(NH₄Cl)処理で回復した(Fig.4B)。さらにシャペロン介在性オートファジー受容体 LAMP-2A のノックダウン細胞に HCV 感染させたところ、HCV 感染による FABP1 蛋白質量の減少は、LAMP-2A ノックダウン細胞ではみられなくなった(Fig.4C)。HCV 感染により減少した HNF-1α 蛋白質量も同様に、LAMP-2A ノックダウンで回復した。このことから、HCV 感染により FABP1 蛋白質量の著しい低下が見られること、その現象に FABP1 の転写調節因子である HNF-1α が関与している可能性が示唆された。HCV 感染によりシャペロン介在性オートファジーを介して HNF-1α のリソソーム分解が引き起こされることが、FABP1 蛋白質量の減少につながると予想される。



(2) FABP1 プロモーター[-111 / -99]に HNF-1α は結合する。

FABP1 プロモーター上のどこに転写因子 HNF-1α が結合するのかを検討するため、FABP1 プロモーター上の予想される HNF-1α 結合部位の変異体を用い、FABP1 プロモーター活性を調べた。その結果、FABP1 プロモーター[-193 / -181]と[-705 / -693]に変異を導入しても、wild type と比べて FABP1 プロモーター活性に影響はなかったが、FABP1 プロモーター[-111 / -99]に変異があると FABP1 プロモーター活性が著しく低下した(Fig.5)。このことから、転写因子 HNF-1α は FABP1 プロモーター[-111 / -99]に結合することが示唆された。



FABP1 は遊離脂肪酸と結合し、遊離脂肪酸の細胞内輸送に働いていることが知られている。そのため、FABP1 発現の減少は、遊離脂肪酸との結合低下とそれに続く肝臓の脂肪化につながると考えられる。今後は HCV 感染による FABP1 発現量の減少によって、脂肪酸輸送に影響を及ぼすかを検討する。

4 生活や産業への貢献および波及効果

昨今、シャペロン介在性オートファジーは、パーキンソン病やハンチントン舞踏病などの神経変性疾患、乳癌の分子機構として注目されている。私共は HCV 感染によりシャペロン介在性オートファジーが活性化され、細胞内の糖代謝異常を惹起する分子機構を解明してきた。HCV が肝細胞に感染すると CMA 標的配列を有した宿主因子を分解誘導し、HCV 増殖に有利な環境を作り出し、病態へとつながっていくことが考えられ、HCV 感染とシャペロン介在性オートファジーの解析により、HCV 感染による新しい病原性発現機構の解明と治療法開発の端緒となることが期待できる。

FABP1 は肝臓と小腸に高発現する脂肪酸結合蛋白質で、遊離脂肪酸と結合することで遊離脂肪酸の輸送に関与し、脂肪蓄積に影響を及ぼす。HCV は肝細胞内に脂肪を貯留させ、HCV 複製の場を効率よく形成する。このことから HCV は脂肪の蓄積により、ウイルス増殖に有利な環境を構築していると推察される。HCV 感染による肝脂肪化のメカニズムを解明することは、HCV 増殖阻害、病態改善へとつながることが考えられ、新規病原性発現機構の解明と HCV による脂質代謝異常の新規治療法開発のための分子基盤の構築につながると推察される。

(References)

1. **Matsui C**, Yuliandari P, Deng L, Abe T, Shoji I. The Role of Chaperone-Mediated Autophagy in Hepatitis C Virus-Induced Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*, 11: 796664, 2021.
2. **Matsui C**, Deng L, Minami N, Abe T, Koike K, Shoji I. Hepatitis C virus NS5A protein promotes the lysosomal degradation of hepatocyte nuclear factor 1 α via chaperone-mediated autophagy. *Journal of Virology*, 13:92(13). pii:e00639-18, 2018.
3. **Matsui C**, Sianipar IR, Minami N, Deng L, Hotta H, and Shoji I. A single-amino-acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupts physical and functional interaction with the transcription factor HNF-1 α . *Journal of General Virology*, 96 (8): 2200-05, 2015.
4. **Matsui C**, Shoji I, Kaneda S, Sianipar IR, Deng L, and Hotta H. Hepatitis C virus infection suppresses GLUT2 gene expression via down-regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α . *Journal of Virology*, 86 (23): 12903-11, 2012.