



C型肝炎ウイルス非構造蛋白質NS5Aと2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素との相互作用およびISDR非依存性・PKR非依存性のインターフェロン抗ウイルス活性の阻害

田口, 高志

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 64(1/2):7-15

(Issue Date)

2003-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00406808>



C型肝炎ウイルス非構造蛋白質 NS5A と 2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素との相互作用 および ISDR 非依存性・PKR 非依存性の インターフェロン抗ウイルス活性の阻害

田 口 高 志

神戸大学大学院研究科ゲノム科学講座
微生物ゲノム学分野（指導：堀田博教授）
連絡先：田口高志
神戸大学大学院医学系研究科ゲノム科学講座
〒650-0017 神戸市中央区楠町 7-5-1
T E L 078-382-5502
T E L 078-382-5519

（平成15年3月19日受付）

要 約

C型肝炎ウイルス（HCV）非構造蛋白質 NS5A 蛋白は二本鎖 RNA 依存プロテインキナーゼ（PKR）との相互作用を介してインターフェロン（IFN）の抗ウイルス活性を阻害すると報告されているが、PKR 以外の分子の関与も示唆されている。本研究では、NS5A が IFN 抗ウイルス活性の重要な実行分子の一つの 2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素（2-5AS）との相互作用を介して、IFN 抗ウイルス活性を阻害する可能性を検討した。NS5A と 2-5AS を培養細胞内で共発現させると両者は結合し、その結合には IFN 感受性決定領域（ISDR）や PKR 結合領域を含まない NS5A アミノ末端領域（aa 1-148）が必須であった。また、NS5A（1-148）の 37 位アミノ酸 Phe を Leu に置換（F37L）すると全長 2-5AS との結合が増強し、F37N では減弱した。一方 2-5AS では中央部の 2 ヶ所（aa52-104, 184-275）が NS5A との結合に必須であった。種々の NS5A を構成的に発現する培養細胞株を用いた実験系において、全長 NS5A と NS5A（1-148）は同程度に脳心筋炎ウイルスに対する IFN の抗ウイルス活性を阻害したが、NS5A（1-148）F37N ではこの阻害効果は減少した。以上の成績より、NS5A が 2-5AS との相互作用を介して、ISDR 非依存性・PKR 非依存性に IFN の抗ウイルス活性を阻害する可

能性が示唆された。

緒 言

C型肝炎ウイルス（HCV）はフラビウイルス科に属するプラス鎖一本鎖 RNA ウイルスで、高率に持続感染を起こし、慢性肝炎・肝硬変・肝細胞癌の主たる要因となっている⁽¹⁾。C型慢性肝炎は、インターフェロン（IFN）単独或いはリバビリンとの併用で治療されるが、その長期有効率は 50%以下である⁽²⁾。9600 塩基からなる HCV ゲノムの塩基配列は多様性を示し、それに基づいて HCV は 6 種類の遺伝子型と 100 種類ものサブタイプに分類される⁽³⁾。HCV ゲノムは約 3000 アミノ酸からなるポリプロテインをコードしており、宿主細胞のシグナルペプチターゼと HCV 固有のプロテアーゼによるプロセッシングを受け、10 種類の成熟ウイルス蛋白質が生じる⁽⁴⁾。

NS5A はそのカルボキシル末端近傍に核移行シグナルを持つが、全長 NS5A は細胞質の核膜周辺部に局在する^(5,6,7)。また、リン酸化程度の異なる 2 種類の形態（p56 と p58）を持ち、リン酸化部位の変異は HCV ゲノムの複製に影響を及ぼすことも示唆されている^(4,6,8,9)。NS5A の中央部（aa237-276）は IFN 感受性決定領域（ISDR）と呼ばれ、サブタイプ 1b では ISDR の変異数と IFN 治療効果との相関が指摘

Key word : C型肝炎ウイルス, 非構造蛋白質 NS5A, 2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素, インターフェロン, 抗ウイルス活性阻害

されている⁽¹⁰⁾。さらに NS5A は、ISDR とそのカルボキシル末端側 26aa を加えた領域 (aa237-302) を介して二本鎖 RNA 依存プロテインキナーゼ (PKR) と結合してその機能を阻害すること^(11,12)、また培養細胞において脳筋炎ウイルス (EMCV) に対する IFN の抗ウイルス活性を阻害することが報告されている^(6,13)。これに対して NS5A による PKR 非依存性の IFN の抗ウイルス活性の阻害の報告もなされている^(14,15)。

本研究では、IFN 抗ウイルス活性の重要な実行分子の一つである 2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素 (2-5AS) と NS5A との相互作用を哺乳類培養細胞系により調べた。両者の種々の欠失変異体を発現するプラスミドを作製し細胞内での両蛋白の結合の有無を調べ、その結合に必須な領域を決定した。さらに、2-5AS と結合するが PKR 結合領域を欠損する NS5A (1-148) を構成的に発現する培養細胞株を樹立し、脳筋炎ウイルス (EMCV) 或いは水疱性口内炎ウイルス (VSV) をチャレンジウイルスとしてウイルスレスキューアッセイを行い、NS5A による ISDR 非依存性の IFN 抗ウイルス活性阻害を明らかにした。

方 法

(1) プラスミド構築

(a) NS5A

FLAG エピトープを pcDNA3.1(-)/Myc-His

Primer	Nucleotide sequence*
NS5A-1	5'-TATAGAAATTCCTCCGGATCCTGGCTAAAG-3'
NS5A-109-R	5'-TATAGAAATTCCTACGCCCTGGAATAGTT-3'
NS5A-148-R	5'-TATAGAAATTCCTATTCGGGGCCGGGAC-3'
NS5A-F37L	5'-AATTGCCCGGAGTCCCTTTCTGTCATGCCAACGCGGTACAAGG-3'
NS5A-F37L-R	5'-CCTTGTACCCGCGTTGGCATGAGGAAAGGGACTCCGGCAATT-3'
NS5A-F37N	5'-AATTGCCCGGAGTCCCTTTCTGTCATGCCAACGCGGTACAAGG-3'
NS5A-F37N-R	5'-CCTTGTACCCGCGTTGGCATGAGGAAAGGGACTCCGGCAATT-3'
NS5A-F37S	5'-AATTGCCCGGAGTCCCTTTCTGTCATGCCAACGCGGTACAAGG-3'
NS5A-F37S-R	5'-CCTTGTACCCGCGTTGGCATGAGGAAAGGGACTCCGGCAATT-3'
2-5AS-1	5'-TATAGGATCCATGAGACACGACCCAGG-3'
2-5AS-52	5'-TATAGGATCCACCCAGTGAAGGTCCTCC-3'
2-5AS-60-R	5'-TATAGGATCCCTACACCCACCTTGGAGAC-3'
2-5AS-104-R	5'-TATAGGATCCCTACTCTTAATTCTCTGAT-3'
2-5AS-144-R	5'-TATAGGATCCCTACTGATGACAGATGGGG-3'
2-5AS-184	5'-TATAGGATCCGATGGCGAGTTCTCTACC-3'
2-5AS-235-R	5'-TATAGGATCCCTACTCTAGGGCGTACTG-3'
2-5AS-275-R	5'-TATAGGATCCCTATGTCCAGTAGATTCG-3'

図 1：本研究で使したプライマー。

a 制限酵素認識サイトを下線で示す。停止コドンに相補的な配列を太字で、点変異導入部位を小文字で示す。

(Invitrogen) に導入して pcDNA-FLAG ベクターを作製した。HCV-1bJk 株^(6,7) の全長 NS5A を pcDNA-FLAG ベクターにサブクローニングして pcDNA-FLAG-NS5A-F (図 2) を作製した。FLAG エピトープと NS5A のアミノ末端 232 残基を含む 0.7-kb の *Nhe* I フラグメントを pcDNA3.1(-)/Myc-His に挿入して pcDNA-FLAG-NS5A (1-232) (図 2) は、種々のプライマー (図 1) を用いた PCR 産物を pcDNA-FLAG ベクターに挿入して作製した。更に QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) とプライマー (図 1) により pcDNA-FLAG-NS5A (1-148) に点変異 (F37L, F37N 及び F37S) を導入した。FLAG-NS5A-F, FLAG-NS5A (1-148) 或いは FLAG-NS5A (1-148)F37N を pCAGGS ベクター⁽¹⁶⁾ に挿入して各々 pCAGGS-FLAG-NS5A-F, pCAGGS-NS5A (1-148) 或いは pCAGGS-NS5A (1-148)F37N を作製し、後述の構成的発現細胞株の樹立に使用した。

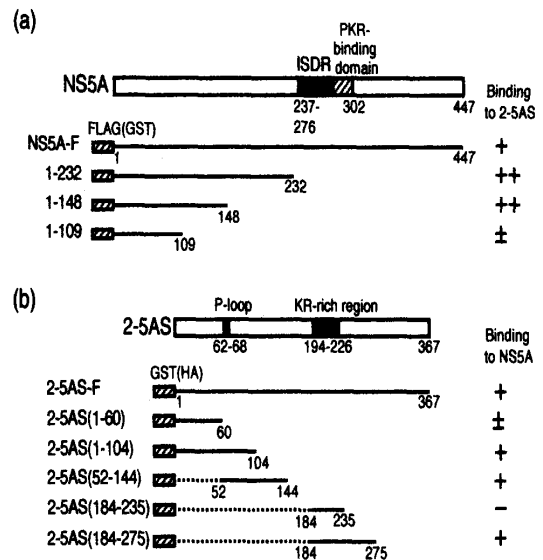


図 2：全長及び欠失変異体 NS5A と 2-5AS。

コンストラクトの下数字はアミノ酸の番号を示す。結合実験の結果を右側に示す。(a) NS5A：FLAG エピトープをアミノ末端に融合した。(b) 2-5AS:GST 或いは HA エピトープをアミノ末端に融合した。

(b) 2-5AS

全長のマウス 2-5AS (DDBJ accession no. X04958) を HA エピトープにインフレームで結合させて pSG5 発現ベクター (Stratagene Cloning Systems) に挿入して pSG-HA-2-5AS-F を作製した。pGEX-4T-1 (Pharmacia Biotech, Sweden) のグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) を pBlueScript II SK

(Stratagene) の *Sma* I サイトに挿入して pBS-GST *Bam* を作製した。全長の 2-5AS を pBS-GST *Bam* の *Bam*HI サイトに挿入して pBS-GST-2-5AS-F (図 2) を作製し、その他の GST 融合 2-5AS 欠失変異体 (図 2) は、プライマー (図 1) を用いた PCR 産物を pBS-GST *Bam* の *Bam*HI サイトに挿入して作製した。

(2) ウェスタンブロッティング

サンプルを 50mM Tris-HCl (pH6.8), 100mM dithiothreitol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue 及び 10% glycerol から成る溶液にて溶解し、12% SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後 (SDS-PAGE) に、PVDF (polyvinylidene difluoride filter) (Bio-Rad) に転写し、マウス抗 FLAG モノクローナル抗体 (F-3165, Sigma) により検出した。バンドシグナルの強度は NIH image1.62 software により算出した。

(3) GST プルダウン

GST 融合 2-5AS 及び FLAG 融合 NS5A を HeLa 細胞に一過性発現させ、NETN バッファー (150mM NaCl, 1 mM EDTA, 10mM Tris-HCl [pH7.4], 0.5% NP40) により細胞を融解し、細胞抽出液を 14,000 回転/分で 5 分間遠心後の上清を 20 μ l のグルタチオン結合セファローズビーズ (Amersham Pharmacia) と 4 $^{\circ}$ C で 90 分間ローテーターにより混合した。ビーズは NETN バッファーにより 5 回洗浄し、ウェスタンブロッティングにより解析した。

(4) 免疫沈降

HA 融合 2-5AS 及び FLAG 融合 NS5A を HeLa 細胞に一過性発現させ、NETN バッファーにより細胞を融解し、遠心後の上清を 0.5 μ g の HA 免疫ウサギ抗血清 (Y-11, Santa Cruz Biotech.) 或いはコントロールとして非免疫ウサギ IgG 抗体と 4 $^{\circ}$ C で 3 時間ローテーターにより混合した。混合液は更に 10 μ l の protein G 結合セファローズビーズ (Amersham Pharmacia) と混合した後、NETN バッファーにより 6 回洗浄し、ウェスタンブロッティングにより解析した。

(5) 一過性発現及び構成的発現細胞株の樹立

一過性発現では HeLa 細胞に T7 RNA polymerase を発現する組み換えワクシニアウイルスを 1 時間感染させ、リボウェクテン (Life Technologies inc.) により発現プラスミドをトランスフェクションした。細胞は 12-16 時間後に上記の結合実験に使用した。構成

的発現細胞株の樹立には L929 細胞に FuGene6 (Roche) により選択プラスミドとして pSV2neo を NS5A 発現プラスミドとトランスフェクションした。G418 (1 mg/dl) 存在下で 2 ~ 3 週培養し、コロニーをクローニングした。

(6) ウイルスレスキューアッセイ

全長 NS5A 或いは NS5A (1-148) を構成的に発現する L929 細胞株或いは非発現対照 L929 細胞株を 2 クローンずつ使用した。L929 細胞株を 2×10^5 cells/well で 6 well プレートに蒔いて 24 時間培養した。細胞を 1, 5 或いは 25U/ml の組み換え型マウス IFN- α A (PBL Biomed. Lab.) で処理後、更に 24 時間培養した。細胞に 50~60 plaque-forming units (PFU)/well の脳心筋炎ウイルス (EMCV; DK-27 株)⁽¹⁷⁾ 或いは水疱性口内炎ウイルス (VSV; New Jersey 株)⁽⁶⁾ を接種して更に 2 日間培養した。プレートをクリスタルバイオレットにて染色しプラーク数をカウントして、各クローン毎に IFN 処理群と非処理群を比較した。

結 果

(1) 培養細胞内での NS5A と 2-5AS の結合の証明および最小結合領域のマッピング

FLAG 融合 NS5A 及び HA 融合 2-5AS を HeLa 細胞で発現させ、エタノール固定後にマウス抗 FLAG モノクローナル抗体及び HA 免疫ウサギ抗血清により免疫染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡 (MRC-1024; Bio-Rad) により解析したところ、NS5A と 2-5AS とともに細胞質に局在し、核膜周辺部において両者の局在は一致した (data not shown)。

HeLa 細胞で発現させた細胞抽出液を用いた結合実験の結果を図 3 と図 4 に示す。まず、GST プルダウン法 (図 3) により、全長 NS5A、NS5A (1-232) 及び NS5A (1-148) は GST-2-5AS-F と結合するが (レーン 2, 4 及び 6), 対照 GST とは結合しない (レーン 1, 3, 5 及び 7) ことがわかった。また、NS5A (1-109) は GST-2-5AS-F と結合しなかった (レーン 8)。なお、NS5A (1-232) 及び NS5A (1-148) と GST-2-5AS-F との結合は、全長 NS5A の場合より強かった。さらに免疫沈降法 (図 4) により、NS5A と 2-5AS の両者を共発現させ、HA 抗体により 2-5AS を沈降した場合のみ (レーン 9), NS5A (1-148) と 2-5AS の共沈が特異的に認められた。以上の成績より、NS5A が全長 2-5AS と結合すること、およそその結合に必要な NS5A の最小領域は (aa1-148) であることが明ら

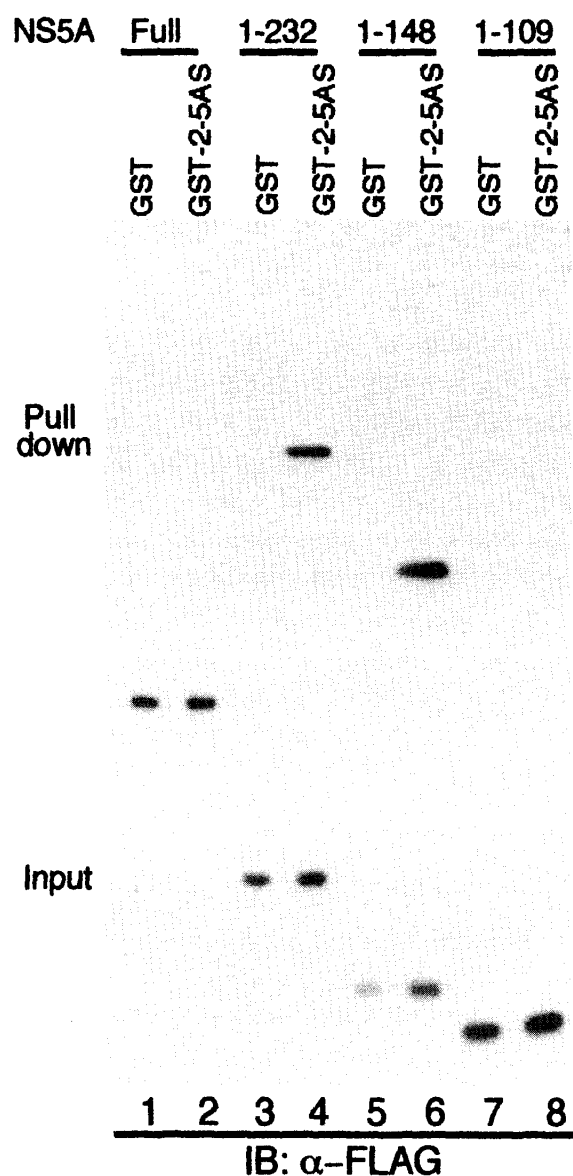


図3：NS5Aの2-5AS結合領域の決定。

HeLa細胞でコントロールGSTまたはGST-2-5ASと共発現させたFLAGタグを融合した全長NS5A(レーン1-2)またはNS5A欠失変異体(レーン3-8)の細胞抽出液をGSTプルダウン後に(pull down: 上段)または非処理で(input: 下段), 抗FLAGモノクローナル抗体にてウェスタンブロットした。

かになった。

次に, このNS5A(1-148)との結合に必要な2-5ASの最小領域をGSTプルダウン法により決定した。図5に示すように, 2-5AS-F, 2-5AS(1-104), 2-5AS(52-144), 2-5AS(1-195)及び2-5AS(184-275)はNS5A(1-148)と結合したが(レーン3-5, 7-8), 2-5AS(1-60)ではNS5A(1-148)との結合は減弱し(レーン2), 2-5

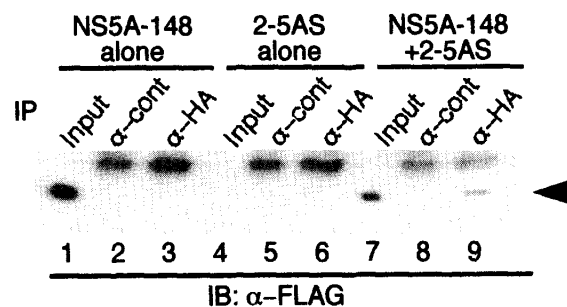


図4：NS5Aと2-5ASの免疫共沈。

FLAG-NS5A(1-148)単独(レーン1-3), HA-2-5AS単独(レーン4-6)及び両者(レーン4-6)をHeLa細胞で発現させた細胞抽出液を非処理(Input: 総量の5%: レーン1, 4及び6), 非免疫ウサギIgG抗体(α -cont: レーン2, 5及び8)或いはHA免疫ウサギ抗血清(α -HA: レーン3, 6及び9)にて免疫沈降した。サンプルを抗FLAGモノクローナル抗体にてウェスタンブロットした。矢印はFLAG-NS5A(1-148)を示す。

AS(184-235)は全く結合しなかった(レーン6)。なお, 対照GSTとNS5A(1-148)との結合は全く認められず, この反応における結合の特異性が確認された(レーン1)。以上の成績より, 2-ASの中央部の2ヶ所(aa52-104, 184-275)がNS5Aとの結合に必要であることが分かった。

我々のこれまでの臨床検体の検討から, NS5Aの37位のアミノ酸残基PheからLeuへの変異(F37L)により, 血清HCV RNA量が高くなる可能性が考えられる(data not shown)。そこでNS5A(1-148)に幾つかの点変異(F37L, F37N, F37S)を導入し, 全長2-5ASとの結合に対する影響をGSTプルダウン法により解析した。図6に示すように, 全長2-5ASとの結合は, 野生型(WT)と比較して, F37Lでは2倍に増強し, 逆にF37Nでは1/3に減弱した。

(2) 全長NS5AおよびNS5A(1-148)によるIFN抗ウイルス活性の阻害:

全長NS5AまたはNS5A(1-148)を構成的に発現するL929細胞株を複数株ずつ樹立し, EMCVまたはVSVをチャレンジウイルスとしてウイルスレスキューアッセイを行った。

EMCVをチャレンジウイルスに用いた場合, 非発現対照細胞株では, IFN(5U/mlまたは25U/ml)処理によりプラーク数がIFN非処理の場合に比べて各々30%と5%に減少し, 用量依存性にIFNの抗ウ

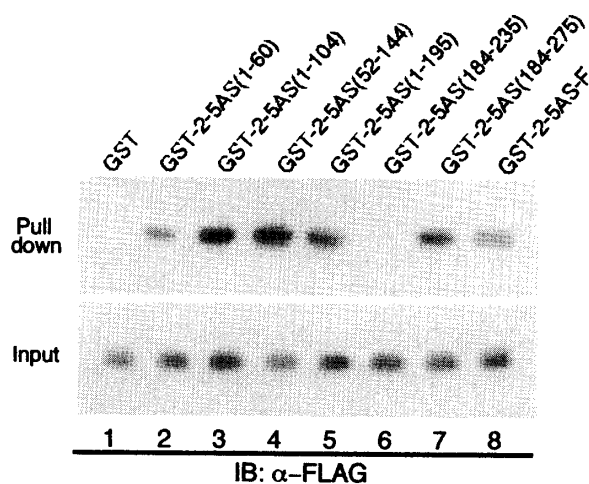


図5：2-5ASのNS5A結合領域の決定。

HeLa細胞でFLAG-NS5A(1-148)と共発現させたコントロールGST単独（レーン1）、GST融合2-5AS欠失変異体（レーン2-7）及びGST-2-5AS（レーン8）の細胞抽出液をGSTプルダウン後に（pull down:上段）或いは非処理で（input:下段）、抗FLAGモノクローナル抗体にてウェスタンブロットした。

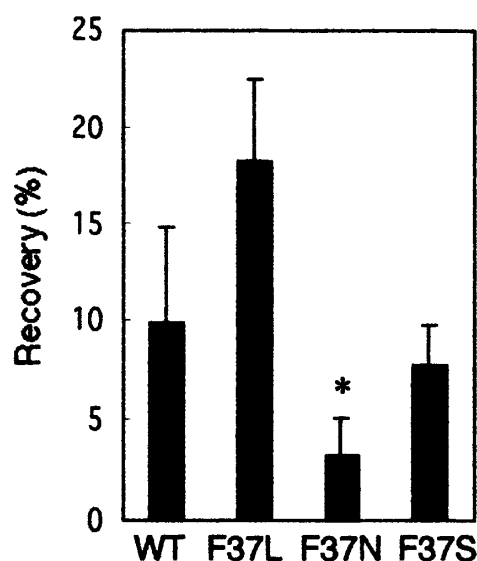


図6：NS5Aの37位のアミノ酸変異に伴う2-5ASとの結合への影響。

GST-2-5AS-Fと共発現させGSTプルダウンを行い、非処理の細胞抽出液とのウェスタンブロット上のバンド強度の比を、3回の実験より平均値及び標準偏差を算出した。（*： $P < 0.01$: F37L発現株との比較。）

ウイルス効果が観察された（図7a）。全長NS5A発現細胞およびNS5A(1-148)発現細胞では、IFN抗ウイ

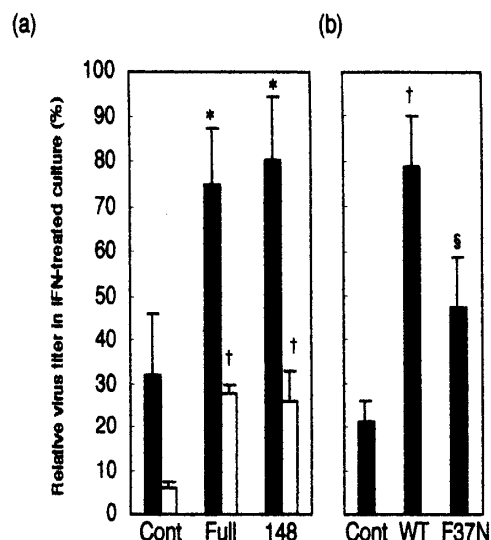


図7：NS5AによるEMCVに対するIFN抗ウイルス効果の阻害。

(a) 非発現対照細胞株、全長NS5A或いはNS5A(1-148) (b) 非発現対照細胞株、NS5A(1-148)WT或いはNS5A(1-148)F37Nの各構成的発現株においてIFN(5 U/ml: Filled columns, 25 U/ml: open columns) 処理後のプラーク数とIFN非処理のプラーク数との比率を示す。（*： $P < 0.05$ ：非発現対照細胞株との比較。†： $P < 0.01$ ：非発現対照細胞株との比較。§： $P < 0.05$ ：非発現対照細胞株或いはNS5A(1-148)WT発現株との比較。）

ルス効果は有意に阻害され、25 U/ml処理による抗ウイルス効果が非発現対照細胞株の5 U/ml処理の場合とほぼ同程度であった。これらの結果より、全長NS5AおよびNS5A(1-148)により、IFN抗ウイルス効果は約1/5に減弱したと考えられた。一方、2-5ASとの結合が減弱しているNS5A(1-148)F37N発現細胞では、IFN抗ウイルス活性の阻害は、野生型NS5A(1-148)発現細胞より有意に弱かった（図7b）。

VSVをチャレンジウイルスに用いた場合、対照細胞株ではIFN(1 U/ml)処理によりプラーク数がIFN非処理の場合に比べて30%に減少した（図8）。一方、全長NS5A発現細胞株やNS5A(1-148)発現細胞株においても、対照細胞株の場合と同程度あるいはより強いIFN抗ウイルス効果が観察され、EMCVを用いた場合にみられた有意なIFN抗ウイルス活性の阻害は認められなかった。

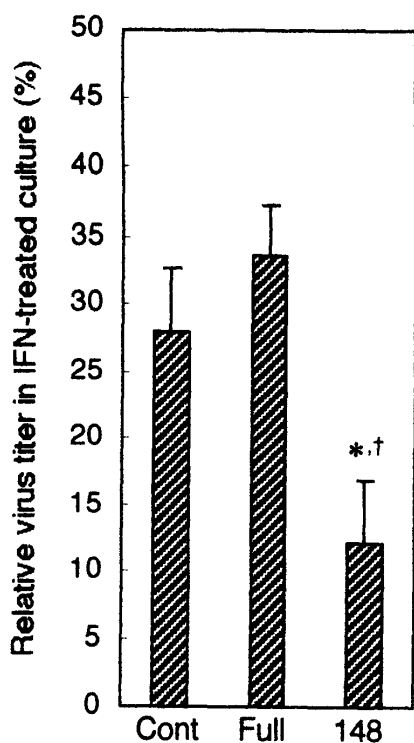


図8：NS5AによるVSVに対するIFN抗ウイルス効果の阻害。

非発現対照細胞株、全長NS5A 或いはNS5A (1-148) の各構成的発現株においてIFN(1 U/ml) 処理後のプラーク数とIFN非処理のプラーク数との比率を示す。(*：P<0.01：全長NS5A 発現株との比較。†：P<0.05：非発現対照細胞株との比較。)

考 察

現在、HCV 蛋白の中では、NS5A と E2 の 2 つが、IFN 抗ウイルス活性を阻害する可能性が報告されている^(6,11,12,13,18,19)。また、臨床的な研究から、NS5A の ISDR (aa237-302) のアミノ酸変異とIFN 治療効果との関連が指摘されている。培養細胞系を用いた研究により、NS5A がIFN 抗ウイルス活性を阻害することを、我々も含めていくつかの研究グループが観察している^(6,13)。更に、NS5A がISDR を含むPKR 結合領域(aa237-302)を介してPKR と結合し、その活性を阻害することが報告されている^(11,12)。しかし、NS5A によるIFN 抗ウイルス活性の阻害は、PKR 活性阻害のみでは説明し得ず、PKR 非依存性・ISDR 非依存性のIFN 抗ウイルス活性阻害の報告もなされている^(8,14,15,20)。

本研究では、IFN 抗ウイルス活性の重要な実行分

子の一つである2-5AS とNS5A との相互作用を、培養細胞系を用いた2種類の手法により証明した。この両者の結合にはNS5A のアミノ末端(aa1-148)と2-5AS の中央部2カ所(aa52-104, 184-275)が必須であった。2-5AS 側の中央部2カ所の結合責任領域のうち、(aa52-104)はATP 結合モチーフ(P-loop)(aa62-68)を含み、(aa184-275)はリジンとアルギニンの含有率の高いdsRNA 結合領域(KRrich region)(aa194-226)を含んでいる⁽²¹⁾が、P-loop やKR rich region はその変異により2-5AS の酵素活性を阻害することが報告されている⁽²¹⁾。これらのことから、2-5AS とNS5A との結合により、2-5AS 活性が阻害される可能性が考えられる。またNS5A の点変異(F37L, F37N, F37S)により、2-5AS との結合の程度が変化した。即ち、F37L により2-5AS との結合は増強し、逆にF37N により減弱した。F37L は血清HCV RNA 高力価と相関するという我々の観察と併せて、NS5A のF37L 変異は2-5AS との結合を増強してその抗ウイルス活性を阻害し、HCV 複製を増強する可能性が示唆された。一方、F37N 変異は患者由来のHCV 株では全く観察されていないが、その理由として、本変異により2-5AS との結合が減弱してその抗ウイルス活性を有効に阻害することができないため、ウイルス増殖の維持が困難であるからではないかと思われる。実際に、NS5A(1-148)F37N によるIFN 抗ウイルス活性の阻害は、野生型NS5A(1-148)より有意に弱いことが実験的に示された(図7b)。

NS5A 側の2-5AS に対する結合責任領域の(aa1-148)については、アミノ末端の30残基はメンブリンアンカードメインとしてNS5A の細胞質への局在を決定していると考えられる^(7,22,23)。我々が決定したアミノ末端(aa1-148)に相当する約19kDa 蛋白が実際の細胞内で成熟ウイルス蛋白質として存在するかについては議論の余地を残しているが、培養細胞内でアポトシス刺激により約19kDa の開裂産物が認められ⁽²³⁾、HCV コア蛋白の共発現が全長NS5A の開裂を促進するという報告があるが⁽²⁴⁾、これらの観察はNS5A(1-148)のウイルス学的意義を考える上で興味深い。

EMCV の増殖はPKR と2-5AS/RNase L 経路の両方により阻害されるが、VSV はPKR やMx 蛋白により阻害されるが2-5AS/RNase L 経路では阻害されないと報告されている^(25,26,27)。我々は以前に全長NS5A がIFN のEMCV に対する抗ウイルス活性阻害を示すもののVSV に対しては殆ど抗ウイルス活性阻害を示さず、NS5A によるPKR 非依存性のIFN 抗ウイルス活性阻害の可能性を報告した⁽⁶⁾。本研究のウイルスレスキューアッセイでも、全長NS5A は

EMCV に対する IFN 抗ウイルス活性を有意に阻害するが、VSV に対する IFN 抗ウイルス活性は殆んど阻害しないことが確認された。一方、NS5A(1-148)発現細胞では、VSV に対する IFN 抗ウイルス活性はより増強されることが示された。この理由として、NS5A(1-148)発現細胞では 2-5AS/RNase L 経路が阻害されるため、PKR を含む他の IFN 作用実行分子が代償的により強く活性化された可能性が考えられる。いずれにせよ、NS5A(1-148)が ISDR や PKR 結合領域を含んでいない事を考慮すれば、本研究の成績は NS5A がそのアミノ末端で 2-5AS と結合して酵素活性を阻害することにより、ISDR 非依存性・PKR 非依存性に IFN 抗ウイルス活性を阻害する可能性を強く示唆するものである。

謝 辞

本研究に当たりご指導頂きました神戸大学大学院医学系研究科ゲノム科学講座微生物ゲノム講座の堀田博教授および研究室の皆様へ深謝いたします。

文 献

- 1) Lauer, G.M., Walker, B.D.: Hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 345:41-52, 2001.
- 2) McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Schiff, E.R., Shiffman, M.L., Lee, W.M., Rustgi, V.K., Goodman, Z.D., Ling, M.-H., Cort, S., Albrecht, J.K.: Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N. Engl. J. Med.* 339:1485-1492, 1998.
- 3) Mellor, J., Holmes, E.C., Jarvis, L.M., Yap, P.L., Simmonds, P., The International HCV Collaborative Study Group: Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. *J. Gen. Virol.* 76:2493-2507, 1995
- 4) Reed, K.E., Rice, C.M.: Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 242:55-84, 2000.
- 5) Ide, Y., Zhang, L., Chen, M., Inchauspe, G., Bahl, C., Sasaguri, Y., Padmanabhan, R.: Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *Gene* 182:203-211, 1996.
- 6) Song, J., Fujii, M., Wang, F., Itoh, M., Hotta, H.: The NS5A protein of hepatitis C virus partially inhibits the antiviral activity of interferon. *J. Gen. Virol.* 80:879-886, 1999.
- 7) Song, J., Nagano-Fujii, M., Wang, F., Florese, R., Fujita, T., Ishido, S., Hotta, H.: Nuclear localization and intramolecular cleavage of N-terminally deleted NS5A protein of hepatitis C virus. *Virus Res.* 69:109-117, 2000.
- 8) Guo, J.-T., Bichko, V. V., Seeger, C.: Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J. Virol.* 75:8516-8523, 2001.
- 9) Kaneko, T., Tanji, Y., Satoh, S., Hijikata, M., Asabe, S., Kimura, K., Shimotohno, K.: Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome. *Biochem. Biophys. Res. commun.* 205:320-326, 1994
- 10) Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Ogura, Y., Izumi, N., Marumo, F., Sato, C.: Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N. Engl. J. Med.* 334:77-81, 1996.
- 11) Gale, M., Jr., Blakely, C.M., Kwieciszewski, B., Tan, S.-L., Dossett, M., Tang, N.M., Korth, M. J., Polyak, S.J., Gretch, D.R., Katze, M.G.: Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol. Cell. Biol.* 18:5208-5218, 1998.
- 12) Gale, M.J. Jr., Korth, M.J., Tang, N.M., Tan, S.-L., Hopkins, D.A., Dever, T.E., Polyak, S.J., Gretch, D.R., Katze, M.G.: Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230:217-227, 1997.
- 13) Polyak, S.J., Paschal, D.M., McArdle, S., Gale, M.J. Jr., Moradpour, D., Gretch, D.R.: Characterization of the effects of hepatitis C virus nonstructural 5A protein expression in human cell lines and on interferon-sensitive

- virus replication. *Hepatology* 29:1262-1271, 1999.
- 14) Francois, C., Duverlie, G., Rebouillat, D., Khorsi, H., Castelain, S., Blum, H.E., Gatignol, A., Wychowski, C., Moradpour, D., Meurs, E. F.: Expression of hepatitis C virus proteins interferes with the antiviral action of interferon independently of PKR-mediated control of protein synthesis. *J. Virol.* 74:5587-5596, 2000.
 - 15) Podelvin, P., Sabile, A., Gajardo, R., Delhem, N., Abadie, A., Lozach, P.-Y., Beretta, L., Brechot, C.: Expression of hepatitis C virus NS5A natural mutants in a hepatocytic cell line inhibits the antiviral effect of interferon in a PKR-independent manner. *Hepatology* 33:1503-1511, 2001.
 - 16) Niwa, H., Yamamura, K., Miyazaki, J.: Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108:193-199, 1991.
 - 17) Dan, K., Seto, Y., Fujita, T., Asaba, Y., Takei, I., Fujita, H., Kato, R.: Characterization of insulin-dependent diabetes mellitus induced by a new variant (DK-27) of encephalomyocarditis virus in DBA/2 mice. *Exp. Anim.* 44:211-218, 1995.
 - 18) Polyak, S.J., Khabar, K.S., Paschal, D.M., Ezelle, H.J., Duverlie, G., Barber, G.N., Levy, D.E., Mukaida, N., Gretch, D.R.: Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J. Virol.* 75:6095-6106, 2001.
 - 19) Taylor, D.R., Shi, S.T., Romano, P.R., Barber, G.N., Lai, M. M. C.: Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285:107-110, 1999.
 - 20) Duverlie, G., Khorsi, H., Castelain, S., Jaillon, O., Izopet, J., Lunel, F., Eb, F., Penin, F., Wychowski, C.: Sequence analysis of the NS5A protein of European hepatitis C virus 1b isolates and relation to interferon sensitivity. *J. Gen. Virol.* 79:1373-1381, 1998.
 - 21) Yamamoto, Y., Sono, D., Sokawa, Y.: Effects of specific mutations in active site motifs of 2',5'-oligoadenylate synthetase on enzymatic activity. *J. Interferon Cytokine Res.* 20:337-344, 2000.
 - 22) Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wolk, B., Hellings, J. A., Blum, H. E., Penin, F., Moradpour, D.: An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J. Biol. Chem.* 277:8130-8139, 2002.
 - 23) Satoh, S., Hirota, M., Noguchi, T., Hijikata, M., Handa, H., Shimotohno, K.: Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by a caspase-like protease(s) in mammalian cells. *Virology* 270:476-487, 2000.
 - 24) Goh, P.-Y., Tan, Y.-J., Lim, S.-P., Lim, S.-G., Tan, Y.-H., Hong, W.-J.: The hepatitis C virus core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage. *Virology* 290:224-236, 2001.
 - 25) Coccia, E.M., Romeo, G., Nissim, A., Marziali, G., Alvertini, R., Affabris, E., Battistini, A., Fiorucci, G., Orsatti, R., Rossi, G. B.: A full-length murine 2-5A synthetase cDNA transfected in NIH-3T3 cells impairs EMCV but not VSV replication. *Virology* 179:228-233, 1990.
 - 26) Hassel, B.A., Zhou, A., Sotomayor, C., Maran, A., Silverman, R. H.: A dominant negative mutant of 2-5A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects of interferon. *EMBO J.* 12:3297-3304, 1993.
 - 27) Li, X.-L., Blackford, J.A., Hassel, B.A.: RNase L mediates the antiviral effect of interferon through a selective reduction in viral RNA during encephalomyocarditis virus infection. *J. Virol.* 72:2752-2759, 1998.

The NS5A protein of Hepatitis C Virus Interacts with 2', 5'-Oligoadenylate Synthetase and Inhibits Antiviral Activity of Interferon in an ISDR-Independent, PKR-Independent Manner

Takashi Taguchi

Divisions of Microbiology, Department of Genome Sciences, Kobe University Graduate School of Medicine

Abstract

The nonstructural protein 5A (NS5A) of hepatitis C virus has been reported to inhibit antiviral activity of interferon (IFN) by interacting with double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR). However, the possibility still remains that another molecule(s) is involved in the NS5A-mediated inhibition of IFN. In the present study we investigated possible interaction between NS5A and 2',5'-oligoadenylate synthetase (2-5AS), which is one of the key molecules in the IFN signaling pathways. Coexpression of both proteins in cultured cells revealed that NS5A physically interacted with 2-5AS through an N-terminal portion of NS5A (amino acid[aa] 1 to 148), which does not harbor the IFN sensitivity-determining region (ISDR) or the PKR-binding region. On the other hand, two separate portions of 2-5AS (aa 52 to 104, and 184 to 275) were involved in the interaction with NS5A. Single point mutations at residue 37 of NS5A(1-148) affected the degree of the interaction with 2-5AS, with a Phe-to-Leu mutation (F37L) augmenting, and a Phe-to-Asn mutation (F37N) diminishing it. Virus rescue assay using cultured cells stably expressing various forms of NS5A demonstrated that full-length NS5A and NS5A(1-148) significantly counteracted antiviral activity of IFN against encephalomyocarditis virus. However, the counteracting effect of NS5A(1-148)F37N was significantly weaker compared with the full-length NS5A and NS5A(1-148). Taken together, our results suggest the possibility that NS5A counteracts IFN antiviral activity through the interaction with 2-5AS in an ISDR-independent, PKR-independent manner.