



## Unconjugated interferon-stimulated gene 15 specifically interacts with the hepatitis C virus NS5A protein via domain I

Minami, Nanae

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2017-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6986号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006986>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

### Unconjugated interferon-stimulated gene 15 specifically interacts with the hepatitis C virus NS5A protein via domain I

非修飾型インターフェロン誘導性遺伝子 15 は C 型肝炎ウイルス NS5A 蛋白質ドメイン I と特異的に相互作用する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

感染制御学

(指導教員：勝二 郁夫教授)

南 奈苗

#### 【背景】

C 型肝炎ウイルス(HCV)はフラビウイルス科ヘパシウイルス属に分類され、一本鎖 RNA をゲノムに持つ。RNA にコードされるポリプロテインは宿主およびウイルスのプロテアーゼによって切断を受け、3 つの構造蛋白質(Core, E1, E2), p7 ポリペプチド、および非構造蛋白質(NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B)が產生される。他の非構造蛋白質と異なり、NS5A は酵素活性を持たないが、様々な宿主因子との相互作用を介してウイルス複製に重要な役割を果たしていると考えられている。

インターフェロン誘導性遺伝子 15 (ISG15) は、I 型インターフェロンによって誘導されるインターフェロン誘導性蛋白質であると同時に、2 つのユビキチン様ドメインを持つユビキチン様分子としても知られている。ユビキチンと同様、E1 (UBE1L), E2 (UbcH8), E3 (Herc5) を介して、基質蛋白質を修飾する (ISGylation)。また、ISG15 は ISGylation とは別に単体でも細胞内に存在し、細胞外へも分泌されることが知られている。近年、この非修飾型 ISG15 もウイルス感染において何らかの役割を果たしているという報告が散見されるようになってきた。

ISG15 は多くのウイルスに対して抗ウイルス因子として働くことが報告されているが、HCV に対してはウイルスの複製を促進する因子として働くことが報告されている。一方で、ISG15 は HCV 感染に対し抑制的に働くとの報告もあり、HCV 感染における ISG15 の役割はいまだ未解明である。

今回、我々は ISGylation とは異なる非修飾型 ISG15 の機能に注目し、HCV 感染における非修飾型 ISG15 の役割について検討した。

#### 【結果】

##### 1. ISG15 と HCV NS5A との相互作用

Huh-7 細胞における ISG15 と各 HCV 蛋白質との相互作用を免疫沈降法にて解析したところ、NS5A が ISG15 と共に沈した。NS3 も ISG15 と共に沈したが、NS3 と NS4A を共発現させると NS3 は共沈しなかった。NS4A は NS3-NS4A 複合体の膜への固定に重要であることが以前より知られており、NS3 が本来の細胞内局在にある場合は、NS3 は ISG15 と相互作用しないと考えられた。NS4B, NS5B, p7, Core は ISG15 と共に沈しなかった。さらに、HCV レプリコン細胞を用いて、IFN によって誘導された内在性 ISG15 と NS5A との相互作用を免疫沈降法にて解析したが、同様に NS5A と内在性 ISG15 の相互作用が示された。以上の結果より、ISG15 は NS5A と特異的に相互作用する事が示唆された。

##### 2. ISG15 変異体と HCV NS5A との相互作用および共局在

ISG15 と NS5A との相互作用が ISGylation 非依存性であるか否かを検討するため、ISGylation に必須である ISG15 の C 末端配列 (LRLRG) を欠失もしくは変異 (LRLRAA) させた変異体を作成した。これら二つの ISG15 変異体と NS5A との相互作用を免疫沈降法に

て検討したが、NS5A はいずれの ISG15 変異体とも共沈し、ISG15 と NS5A の相互作用は ISGylation 非依存性であることが示唆された。また免疫蛍光染色および Proximity ligation assay (PLA)法にて、これらの ISG15 変異体と HCV レプリコン細胞内の NS5A が核周囲で共局在することが示された。

### 3. NS5A domain I と ISG15 の相互作用

NS5A の ISG15 結合領域を NS5A の各種欠失変異体を用いて免疫沈降法にて解析した。NS5A の domain I を含む変異体のみが ISG15 と共に沈し、その中でも NS5A domain I の aa 1-126 が ISG15 との相互作用に重要であることが示唆された。

#### 【考察】

本研究では、非修飾型 ISG15 と HCV 蛋白質との相互作用について解析し、NS5A と非修飾型 ISG15 が特異的に相互作用することが示された。また免疫蛍光染色および PLA 法にて非修飾型 ISG15 と NS5A との共局在が示された。NS5A と非修飾型 ISG15 との相互作用には、NS5A ドメイン I の aa 1-126 が重要であると考えられた。

ISG15 の発見以来、ISG15 の研究は主に ISGylation に焦点が当てられていたが、近年非修飾型 ISG15 の重要性を示す報告が散見されるようになってきた。チクングニアウイルスに関する研究では、ISG15 ノックアウトマウスではウイルス感染に対する感受性が上がったのに対し、UBE1L ノックアウトマウスでは野生型と同等の表現型を示したことが報告され、チクングニアウイルス感染における非修飾型 ISG15 の重要性が示唆された。また、別の研究では非修飾型 ISG15 が E3 ユビキチンリガーゼである Nedd4 と結合して Nedd4 によるエボラウイルス VP40 のユビキチン化を阻害し、ウイルス粒子放出を抑制すると報告されている。これらの報告は、ウイルス感染における非修飾型 ISG15 の重要性を示唆しており、本研究の結果からも非修飾型 ISG15 が HCV の生活環および病原性に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

今後、本研究で示された NS5A ドメイン I と非修飾型 ISG15 との相互作用がウイルス複製や粒子形成、もしくは HCV の免疫回避機構に影響を及ぼしているか否かを検討することが必要である。これらの研究は、HCV 生活環および病原性における新たな分子機序の解明につながると考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2714 号	氏名	南 奈苗
論文題目 Title of Dissertation	Unconjugated interferon-stimulated gene 15 specifically interacts with the hepatitis C virus NS5A protein via domain I  非修飾型インターフェロン誘導性遺伝子 15 は C 型肝炎ウイルス NS5A 蛋白質ドメイン I と特異的に相互作用する		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 林 祥岡 副査 Vice-examiner 眞庭 謙昌 副査 Vice-examiner 勾坂 敏朗		
神戸大学大学院医学(系)研究科 (博士課程)			

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

### 要旨

C 型肝炎ウイルス(HCV)はフラビウイルス科ヘパシウイルス属に分類され、一本鎖 RNA をゲノムに持つ。RNA にコードされるポリプロテインは宿主およびウイルスのプロテアーゼによって切断を受け、3 つの構造蛋白質(Co<sub>re</sub>、E1、E2)、p7 ポリペプチド、および非構造蛋白質(NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)が産生される。他の非構造蛋白質と異なり、NS5A は酵素活性を持たないが、様々な宿主因子との相互作用を介してウイルス複製に重要な役割を果たしていると考えられている。

インターフェロン誘導性遺伝子 15 (ISG15) は、I 型インターフェロンによって誘導されるインターフェロン誘導性蛋白質であると同時に、2 つのユビキチン様ドメインを持つユビキチン様分子としても知られている。ユビキチンと同様、E1 (UBE1L)、E2 (UbcH8)、E3 (Herc5) を介して、基質蛋白質を修飾する (ISGylation)。また、ISG15 は ISGylation とは別に単体でも細胞内に存在し、細胞外へも分泌されることが知られている。近年、この非修飾型 ISG15 もウイルス感染において何らかの役割を果たしているという報告が散見されるようになってきた。

ISG15 は多くのウイルスに対して抗ウイルス因子として働くことが報告されているが、HCV に対してはウイルスの複製を促進する因子として働くことが報告されている。一方で、ISG15 は HCV 感染に対し抑制的に働くとの報告もあり、HCV 感染における ISG15 の役割はまだ未解明である。

本研究においては ISGylation とは異なる非修飾型 ISG15 の機能に注目し、HCV 感染における非修飾型 ISG15 の役割について検討された。

#### 1. ISG15 と HCV NS5A との相互作用

Huh-7 細胞における ISG15 と各 HCV 蛋白質との相互作用を免疫沈降法にて解析したところ、NS5A が ISG15 と共に沈した。NS3 も ISG15 と共に沈したが、NS3 と NS4A を共発現させると NS3 は共沈しなかった。NS4A は NS3-NS4A 複合体の膜への固定に重要であることが以前より知られており、NS3 が本来の細胞内局在にある場合は、NS3 は ISG15 と相互作用しないと考えられた。NS4B、NS5B、p7、Co<sub>re</sub> は ISG15 と共に沈しなかった。さらに、HCV レプリコン細胞を用いて、IFN によって誘導された内在性 ISG15 と NS5A との相互作用を免疫沈降法にて解析したが、同様に NS5A と内在性 ISG15 の相互作用が示された。以上の結果より、ISG15 は NS5A と特異的に相互作用する事が示唆された。

#### 2. ISG15 変異体と HCV NS5A との相互作用および共局在

ISG15 と NS5A との相互作用が ISGylation 非依存性であるか否かを検討するため、ISGylation に必須である ISG15 の C 末端配列 (LRLRGG) を消失もしくは変異 (LRLRAA) させた変異体を作成した。これら二つの ISG15 変異体と NS5A との相互作用を免疫沈降法にて検討したが、NS5A はいずれの ISG15 変異体とも共沈し、ISG15 と NS5A の相互作用は ISGylation 非依存性であることが示唆された。また免疫蛍光染色および Proximity ligation assay (PLA) 法にて、これらの ISG15 変異体と HCV レプリコン細胞内の NS5A が核周囲で共局在することが示された。

### 3. NS5A domain I と ISG15 の相互作用

NS5A の ISG15 結合領域を NS5A の各種欠失変異体を用いて免疫沈降法にて解析した。NS5A の domain I を含む変異体のみが ISG15 と共に沈し、その中でも NS5A domain I の aa 1-126 が ISG15 との相互作用に重要であることが示唆された。

本研究では、非修飾型 ISG15 と HCV 蛋白質との相互作用について解析し、NS5A と非修飾型 ISG15 が特異的に相互作用することが示された。また免疫蛍光染色および PLA 法にて非修飾型 ISG15 と NS5A との共局在が示された。NS5A と非修飾型 ISG15 との相互作用には、NS5A ドメイン I の aa 1-126 が重要であると考えられた。

ISG15 の発見以来、ISG15 の研究は主に ISGylation に焦点が当てられていたが、近年非修飾型 ISG15 の重要性を示す報告が散見されるようになってきた。チクングニアウイルスに関する研究では、ISG15 ノックアウトマウスではウイルス感染に対する感受性が上がったのに対し、UBE1L ノックアウトマウスでは野生型と同等の表現型を示したことが報告され、チクングニアウイルス感染における非修飾型 ISG15 の重要性が示唆された。また、別の研究では非修飾型 ISG15 が E3 ユビキチンリガーゼである Nedd4 と結合して Nedd4 によるエボラウイルス VP40 のユビキチン化を阻害し、ウイルス粒子放出を抑制すると報告されている。これらの報告は、ウイルス感染における非修飾型 ISG15 の重要性を示唆しており、本研究の結果からも非修飾型 ISG15 が HCV の生活環および病原性に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

今後、本研究で示された NS5A ドメイン I と非修飾型 ISG15 との相互作用がウイルス複製や粒子形成、もしくは HCV の免疫回避機構に影響を及ぼしているか否かを検討することが必要である。これらの研究は、HCV 生活環および病原性における新たな分子機序の解明につながると考えられた。

本研究は、HCV 感染における非修飾型 ISG15 の役割について、その HCV 蛋白質との相互作用を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった非修飾型 ISG15 による NS5A との特異的な相互作用と PLA 法にて非修飾型 ISG15 と NS5A との共局在が確認された。ウイルス感染、特に HCV 感染における非修飾型 ISG15 の役割について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位をえる資格があると認める。