

**DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY
LABORATORY OF HUMAN TUMOR VIRUSES**

1) Serum derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes: H. H. Aly, K. Watashi, M. Hijikata, H. Kaneko, Y. Takada, H. Egawa, S. Uemoto, K. Shimotohno

At this moment, we don't have an efficient in vitro infection system for natural HCV from sera of patients with hepatitis C. We, therefore, aimed to establish an immortalized hepatocyte cells that could be infected by HCV particles from patients' sera. We transduced primary human hepatocytes with human telomerase reverse transcriptase together with human papilloma virus 18/E6E7 (HPV18/E6E7) genes to immortalize cells. Finally we analyzed HCV infectivity in these established immortalized cells. Even after prolonged culture HPV18/E6E7-immortalized hepatocytes exhibited hepatocyte functions and marker expression and were prone to HCV infection. The susceptibility of HPV18/E6E7-immortalized hepatocytes to infection of HCVs, including those of genotype 1b, and 2a, was further improved, in particular, by impairing signaling through interferon regulatory factor-7. We observed HCV infection and replication in these cells were effectively inhibited by treatments of CsA or NIM811. The susceptibility of HPV18/E6E7-immortalized hepatocytes to HCV infectivity was also further improved in these cells by the utilization of 3-dimensional cell culture system. Newly established these immortalized hepatocytes are useful for the analyses of HCV infection, anti-HCV innate immune response, and screening of antiviral agents with a variety of HCV strains.

2) The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production: Y. Miyanari, K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata, K. Shimotohno

The lipid droplet (LD) is an organelle that is used for the storage of neutral lipids. It dynamically moves through the cytoplasm, interacting with other organelles, including the endoplasmic reticulum (ER). These interactions are thought to facilitate the transport of lipids and proteins to other organelles. HCV capsid protein (Core) associates with the LD, envelope proteins E1 and E2 reside in the ER lumen, and the viral replication complexes are assumed to localize on ER-derived membranes. We showed that the LD is involved in the production of infectious virus particles using the infectious recombinant HCV (JFH-1) producing cultured cells, which have been developed recently. We demonstrated that Core recruits nonstructural (NS) proteins and replication complexes to LD-associated membranes, and that this recruitment is critical for producing infectious viruses (Fig. 3). Furthermore, virus particles were observed in close

proximity to LDs, indicating that some steps of virus assembly take place around LDs. This study reveals a novel function of LDs in the assembly of infectious HCV and provides a new perspective on how viruses usurp cellular functions.

3) Anti-hepatitis C Virus Activity of Tamoxifen Reveals the Functional Association of Estrogen Receptor with Viral RNA Polymerase NS5B: K. Watashi, D. Inoue, M. Hijikata, K. Goto, H. H. Aly, K. Shimotohno

Hepatitis C virus (HCV) is a major causative agent of hepatocellular carcinoma. HCV genome replication occurs in the replication complex (RC) around the endoplasmic reticulum membrane. However, the mechanisms regulating the HCV RC remain widely unknown. Here, we used a chemical biology approach to show that estrogen receptor (ESR) is functionally associated with HCV replication. We found that tamoxifen suppressed HCV genome replication. Part of ESR alpha resided on the endoplasmic reticulum membranes and interacted with HCV RNA polymerase NS5B. RNA interference-mediated knockdown of endogenous ESR alpha reduced HCV replication. Mechanistic analysis suggested that ESR alpha promoted NS5B association with the RC and that tamoxifen abrogated NS5B-RC association. Thus, ESR alpha regulated the presence of NS5B in the RC and stimulated HCV replication. Moreover, the ability of ESR alpha to regulate NS5B was suggested to serve as a potential novel target for anti-HCV therapeutics.

4) The expression of phosphatidic acid phosphatase 2a, which hydrolyzes lipids to generate diacylglycerol, is regulated by p73, a member of the p53 family: T. Ishida, A. Iwai, M. Hijikata, K. Shimotohno

p73, a p53-related gene, is essential for a development of animals, while p53 is important for tumor formation. And little is known about the target genes specifically regulated by p73. Identifying the specific targets of p73 is important to understand the physiological roles of p73. To identify the genes specifically regulated by p73, we conducted serial analysis of gene expression to quantitatively evaluate messenger RNA populations. We found that the gene for phosphatidic acid phosphatase 2a (PAP2a), an enzyme that hydrolyzes lipids to generate diacylglycerol, was specifically upregulated by ectopic production of p73 beta. The promoter region of this gene contains an element that is functionally responsive to p73 beta. And the quantity of PAP2a protein was upregulated by ectopic production of p73 beta. These results suggest that the expression of PAP2a is directly regulated by p73.

5) Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125: K-I. Arimoto, H. Takahashi, T. Hishiki, H. Konishi, T. Fujita, K. Shimotohno

Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) plays a pivotal role in the regulation of cytokine production induced by pathogens. The RIG-I also augments the production of IFN and other cytokines via an amplification circuit. Because the production of cytokines is closely controlled, up- and down-regulation of RIG-I signaling also needs strict regulation. The mechanism of this regulation, however, remains elusive. Here, we found that RIG-I undergoes proteasomal degradation after conjugation to ubiquitin by RNF125. Further, RNF125 conjugates ubiquitin to MDA5, a family protein of RIG-I as well as IPS-I, which is also a downstream protein of RIG-I signaling that results in suppressing the functions of these proteins. Because RNF125 is enhanced by IFN, these functions constitute a negative regulatory loop circuit for IFN production.

List of Publications

Division of Viral oncology

Laboratory of Human Tumor Viruses

Aly H. H., Watashi K., Hijikata M., Kaneko H., Takada Y., Egawa H., Uemoto H., Shimotohno K.: Serum derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J. Hepatol.*, 46: 26-36, 2007

El-Farrash M. A., Aly H. H., Watashi K., Hijikata M., Egawa H., Shimotohno K.: In vitro infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporin. *Microbiol. Immunol.* 51(1): 127-133, 2007

Ishida T., Iwai A., Hijikata M., Shimotohno K.: The expression of phosphatidic acid phosphatase 2a, which hydrolyzes lipids to generate diacylglycerol, is regulated by p73, a member of the p53 family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 353: 74-79, 2007

Arimoto K-I., Takahashi H., Hishiki T., Konishi H., Fujita T., Shimotohno K.: Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104 (18): 7500-7505, 2007

Endo Y., Marusawa H., Kinoshita K., Morisawa T., Sakurai T., Okazaki I-M., Watashi K., Shimotohno K., Honjo T., Chiba T.: Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF-kappa B signaling. *Oncogene*, 26 (38): 5587-5595, 2007

Miyanari Y., Atsuzawa K., Usuda N., Watashi K., Hishiki T., Zayas M., Bartenschlager R., Wakita T., Hijikata M., Shimotohno K.: The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production., *Nat. Cell Biol.*, 9 (9): 1089-1097, 2007

Arimoto K-I., Konishi H., Shimotohno K.: UbcH8 regulates ubiquitin and ISG15 conjugation to RIG-I. *Mol. Immunol.* 45 (4): 1078-1084, 2007

Hishiki T., Ohshima T., Ego T., Shimotohno K.: BCL3 acts as a negative regulator of transcription from the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat through interactions with TORC3. *J. Biol. Chem.* 282: 28335-28343, 2007

Watashi K., Inoue D., Hijikata M., Goto K., Aly H.H., Shimotohno K.: Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptors with viral RNA polymerase NS5B. *J. Biol. Chem.*, 282: 32765-32772, 2007

Watashi K., Shimotohno K.: Chemical genetics approach to hepatitis C virus replication: Cyclophilin as a target for anti-hepatitis C virus. *Rev. Med. Virol.*, 17 (4): 245-252, 2007

Isono O., Ohshima T., Matsumoto J., Shimotohno K.: Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of c-Jun mediated by HTLV-1 HBZ. Keystone Symposia (ubiquitin and signaling), Montana, USA, 4-9th Feb., 2007

Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T, Shimotohno K.: Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125, Keystone Symposia (Ubiquitin and Signaling), 104, Montana USA. 4-9th Feb., 2007

Isono O., Ohshima T., Matsumoto J., Shimotohno K.: Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of c-Jun mediated by HTLV-1 HBZ. 13th International Conference on Human Retrovirology, Hakone, Japan, 21-25th May, 2007

Aly H.H., Hijikata M., Shimotohno K. A novel culture system for HCV infection and replication. The 14th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, Glasgow, UK, September 2007

Goto K., Watashi K., Murata T., Hishiki T., Hijikata M., Shimotohno K. The emergence of a cyclophilin inhibitor-resistant HCV variant with a mutation in NS5A. The 14th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, Glasgow, UK, September 2007

Goto K., Watashi K., Hijikata M., Shimotohno K.: Cellular factors revealed by antiviral chemicals

screened out lead a new treatment for Hepatitis C virus. P23. 14th East Asia Joint Symposium. Tokyo, Japan. 13th November, 2007.

後藤覚、渡士幸一、土方誠、下遠野邦忠：シクロフィリン阻害剤によるC型肝炎ウイルスゲノム複製阻害効果の解析 第7回抗ウイルス療法研究会、平成19年5月25日、高松、2007

磯野修、大島隆幸、佐伯泰、土方誠、田中啓二、下遠野邦忠：HTLV-1 HBZ蛋白質による新規なプロテアソーム依存的分解促進機構 第8回文部科学省特定領域研究「がん」5領域若手研究者ワークショップ、平成19年8月、蓼科、2007

村上善基、土方誠、下遠野邦忠：マイクロRNAを用いた新規HCV治療法の確立 第66回日本癌学会学術総会、平成19年9月、横浜 2007

酒井正史、岡本実佳、後藤志典、馬場千晶、王欽、後藤覚、渡士幸一、下遠野邦忠、馬場昌範：非ステロイド系抗炎症薬の抗フラビウイルス効果 第55回日本ウイルス学会学術集会、平成19年10月22日、札幌、2007

宮成悠介、厚沢季美江、臼田信光、土方誠、下遠野邦忠：C型肝炎ウイルス(HCV)粒子産生と脂肪小滴 第30回日本分子生物学会年会 / 第80回日本生化学会大会(合同大会) 平成19年12月、横浜、2007

磯野修、大島隆幸、佐伯泰、土方誠、田中啓二、下遠野邦忠：HTLV-1 HBZ蛋白質によるユビキチン非依存的なc-Jun分解促進機構 第30回日本分子生物学会年会 / 第80回日本生化学会大会(合同大会) 平成19年12月。横浜、2007

昨年3月で下遠野邦忠前教授が退職され、また渡士幸一助教が休職し米国 NIH に留学しているため、今年度は職員として土方 誠と秘書として非常勤職員の山本佳奈が5月半ばまで、そしてそれ以降は山本に代わり金田律子が研究室の運営をおこなっている。研究に参加しているのは、博士研究員として Hussein H. Aly、医学研究科博士課程3年生の有元啓一郎と後藤 覚、薬学研究科博士課程3年生の磯野 修、研究生の Qi Yue と久島透嘉、実験補助員として清長 豊である。

- (1) 血清由来 C 型肝炎ウイルスはインターフェロン調節因子-7 が抑制された不死化ヒト初代培養肝細胞に感染し増殖する。

現在のところ、C型肝炎患者由来の天然型 HCV が効率良く感染増殖する培養細胞系は存在していない。そこで我々はその HCV が感染増殖することが可能な不死化肝細胞を樹立することを目指した。我々はヒト初代培養肝細胞にヒトテロメラーゼ遺伝子とヒトパピローマウイルスの E6 そして E7 タンパク質発現プラスミドを導入し、この細胞を不死化した。この細胞は長期にわたる培養条件下でも肝細胞としての性質を維持し、遺伝子発現様式も肝細胞と極めて類似していた。さらにこの細胞は血清由来 HCV がこれまで用いられてきた細胞に比べて効率良く感染増殖することがわかった。これらの細胞のインターフェロンシグナルの中で特にインターフェロン調節因子 7 の活性を抑制することで数種の異なる遺伝子型に属する HCV の感染増殖効率が上昇することがわかった。また、この感染実験系において HCV の感染増殖はシクロスポリン A や NIM811 といった抗 HCV 効果を有することが知られている薬剤で抑制できた。血清由来 HCV の感染増殖の効率はこの細胞を立体培養することでも上昇した。以上のことからこの新たに樹立した不死化肝細胞は HCV 感染増殖や抗 HCV 自然免疫の研究に用いることが可能であり、また多様な血清由来 HCV に対応した薬剤のスクリーニングに利用することが可能であると考えられる。

- (2) 脂肪滴は C 型肝炎ウイルス粒子産生に重要な役割を果たす細胞内小器官である。

脂肪滴は中性脂肪の蓄積に用いられる細胞内小器官であり、小胞体を含む他の細胞内小器官と相互作用しながら細胞質内を動的に動くことが知られている。また、このような相互作用によって脂質やタンパク質を他の細胞内小器官へと運んでいると考えられている。HCV のウイルス粒子中核を形成するコアタンパク質は細胞内で脂肪滴表面に存在し、ウイルスの外被を構成するエンベロープタンパク質群は小胞体内腔の存在し、ウイルス遺伝子複製複合体は小胞体に由来する細胞内膜上に存在することが知られている。我々は最近樹立された感染性組換え体 HCV である JFH-1 株のウイルス粒子産生細胞を用いて、脂肪滴が感染性ウイルス粒子産生に関与していることを示した。我々はコアタンパク質が HCV 非構造タンパク質群やウイルス遺伝子複製複合体を脂肪滴随伴膜構造に集合させ、その集合が感染性ウイルス産生に必須であることを示した。さらに、ウイルス粒子は脂

脂肪滴に近傍で観察された。このことはウイルス粒子形成の何らかのステップが脂肪滴周囲でおこなわれていることを示している。この研究から感染性 HCV 粒子形成に機能する脂肪滴の新たな役割を明らかになり、ウイルスが細胞機能をどのように利用するかという点で新たな方法を提示することができた。

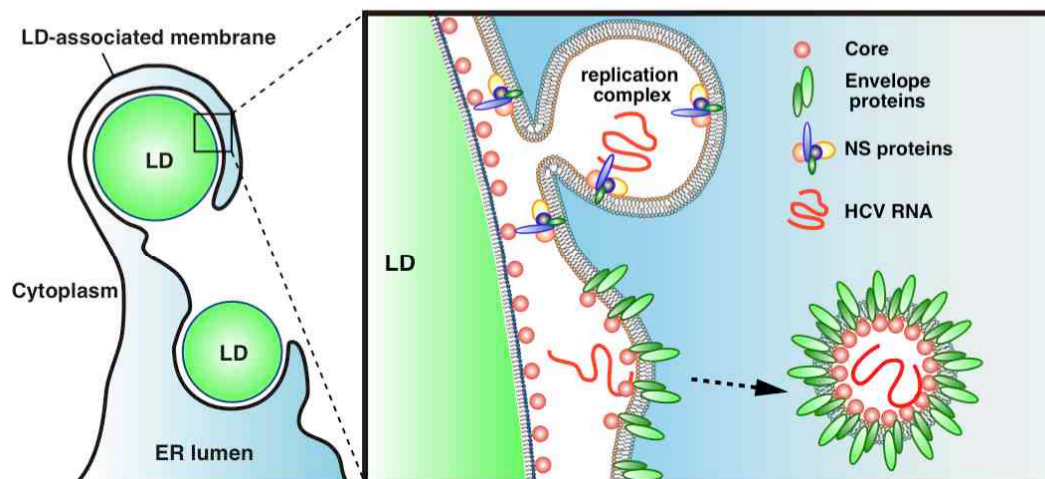


図) 感染性 HCV 粒子産生モデル

粒子の中心を形成するコアタンパク質は脂肪滴の単層脂質膜上に局在化している。HCV タンパク質は脂肪滴と小胞体に由来する脂質二重膜（脂肪滴結合膜）を集合させる。コアタンパク質は HCV 遺伝子複製複合体を含む HCV タンパク質群を脂肪滴周囲に引きつける。脂肪滴周囲に存在する HCV の非構造タンパク質はそこで感染性ウイルス粒子の産生に関与する。HCV 外被タンパク質である E2 タンパク質も脂肪滴周囲に存在する。これらのタンパク質間の相互作用によって感染性ウイルス粒子形成がこのような局所的環境で進行する。

- (3) タモキシフェンによる抗 C 型肝炎ウイルス活性の解析からウイルス RNA ポリメラーゼ NS5B とエストロゲン受容体が機能的に関係をもっていることが明らかとなった。

C 型肝炎ウイルスは肝がんの主要な原因である。HCV 遺伝子複製は小胞体膜周囲に存在する複製複合体においておこなわれる。しかしながら、HCV 遺伝子複製複合体の調節機構はほとんどわかっていない。そこで我々は化学物質を用いた生物学の手法を用いてエストロゲン受容体が HCV 遺伝子複製に機能的に関与していることを明らかにした。我々はタモキシフェンが HCV 遺伝子複製を抑制することを見いだした。エストロゲン受容体 alpha (ESR alpha) の一部は小胞体膜上に存在し、HCV の RNA ポリメラーゼである NS5B タンパク質と相互作用した。RNAi を用いて内在性 ESR alpha の発現を抑制すると HCV 遺伝子複製が抑制された。メカニズムの解析から ESR alpha は NS5B の複合体への結合を促進し、タモキシフェンはその結合に阻害的に働くことが示唆された。このように ESR alpha は NS5B の複製複合体中の存在を制御することで HCV 遺伝子複製に関わることが考えられ

た。NS5B を制御する ESR alpha の機能は抗 HCV 治療のための新たな標的となる可能性がある。

- (4) リピッドを加水分解してジアシルグリセロールを産生するホスファチジン酸ホスファターゼの発現は p53 ファミリー分子の一つである p73 によって制御されている。

p53 は癌形成と密接に関連した遺伝子であるが、p53 関連遺伝子である p73 は動物の発生過程に必須の遺伝子である。しかしながら、p73 によって特異的に調節される標的遺伝子についてはほとんど明らかになっていない。このような特異的標的遺伝子を同定することは p73 の生理的な役割を理解するのに重要である。そこでこのような遺伝子を同定するために我々は serial analysis of gene expression 法を用いて mRNA の定量的評価をおこなった。その結果、リピッドを加水分解してジアシルグリセロールを産生するホスファチジン酸ホスファターゼ 2a (PAP2a) 遺伝子が外来性に発現させた p73beta によって特異的に発現誘導されることを見出した。この遺伝子のプロモーター領域には p73beta に機能的に反応する領域が存在していた。これらの結果は PAP2a の発現が p73 によって直接的に制御されていることを示唆している。

- (5) ユビキチンリガーゼ RNF125 による RIG-I シグナルの抑制的制御

リチノイン酸誘導性遺伝子 I (RIG-I) は病原性因子によるサイトカイン産生制御に重要な役割を果たしている。RIG-I はまた、インターフェロン (IFN) や他のサイトカイン産生を増幅回路により亢進する。サイトカインの産生は厳密に制御されているため、RIG-I シグナルの増加減少調節も厳密な制御が必要である。しかしながら、この制御機構はまだ不明である。ここで我々は RIG-I が RNF125 によるユビキチン化の後、プロテアソームによって分解されることを見出した。さらに RNF125 は RIG-I 関連因子である MDA5 も、RIG-I シグナル下流のタンパク質である IPS-I と同様にユビキチン化し、これらのタンパク質の機能を抑制した。RNF125 は IFN によって誘導されるため、これらの機能は IFN 産生に関する抑制制御ループ回路を構成していることが考えられる。