The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Hepatocyte factor JMJD5 regulates HBV replication through interaction with HBx
Author(s)	幸脇, 貴久
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/55831
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

[Format-P02]

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	幸脇　貴久
論文題名 Title	Hepatocyte factor JMJD5 regulates HBV replication through interaction with HBx (肝細胞因子JMJD5はHBxとの相互作用を介してHBV複製を制御する)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

B型肝炎ウイルス(HBV)感染は世界でおよそ３億人の感染者がいるとされ、慢性感染した場合では肝炎、肝硬変、肝細胞癌の要因となる。HBVゲノムにコードされているHBx蛋白質は、肝発癌やウイルス複製に関与していることが報告されているが、その分子メカニズムは不明な点が多い。本研究では、HBxと相互作用する宿主蛋白質を同定し、その機能解析を目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

HBxと相互作用する宿主蛋白質を免疫沈降法ならびに質量分析によって同定した。さらに、酵母2ハイブリッド法を用いて、HBxと直接結合する宿主因子を探索し、Jumonji-C domain containing protein 5 (JMJD5)がHBxと結合することが分かった。そこで、HBVの生活環におけるJMJD5の役割を調べるために、HBV感染を許容するHepG2 NTCP-C4細胞を用いてshRNAを用いてJMJD5の発現を抑制した細胞株を作成した。この細胞株にHBVを感染させると、コントロール細胞に比べて、HBV DNA量、HBV RNA量、培養上清中に放出されるコア蛋白質量は顕著に抑制された。さらに、ウイルス複製が恒常的に行われているHepG2.2.15細胞でも同様にshRNAを用いて、JMJD5の発現を抑制したところ、HBV DNA量は減少したが、HBV RNA量は変化がなかった。また、ヒト肝癌細胞株であるHuh7細胞を用いて、CRISPR/Cas9法でJMJD5遺伝子を欠損したJMJD5欠損Huh7細胞と作製した欠損細胞にJMJD5の発現を回復させた回復細胞を作製した。この両者の細胞にHBVプラスミドを導入しHBV複製能を検討したところ、JMJD5欠損細胞ではその回復細胞に比べて、顕著にHBV DNA量が減少していた。JMJD5欠損細胞とその回復細胞ではHBV RNAの転写には差がなく、HBV RNAがコア粒子に取り込まれ、HBV DNAができる段階でJMJD5欠損細胞と回復細胞で顕著な差が見られることから、JMJD5とHBxの相互作用はウイルスRNA転写後に何らかの関与を行っていることが示唆された。また、JMJD5のHBxによるウイルス複製への影響を調べるために、HBxが翻訳されないHBVプラスミド(pHBVΔX)を用いて、JMJD5KO Huh7細胞とその回復細胞に導入しHBV複製への影響を調べた。その結果、回復細胞ではHBV複製はHBx発現により上昇したが、JMJD5欠損細胞ではHBxを発現させてもHBV複製は上昇しなかったことから、HBxはJMJD5を介してHBV複製に関与していることが示唆された。

次に、JMJD5とHBxの結合領域を検討し、JMJD5の135番目のGlyをGluに置換することで、HBxとの相互作用能が欠失することを見出した。そこで、JMJD5とHBxの相互作用の重要性を検討するために、JMJD5欠損細胞にJMJD5の135番目のGlyをGluに置換した変異体を導入し、HBV複製への影響を調べたところ、HBxとの結合能を失ったJMJD5ではHBV複製を支持しなかったことから、HBxとJMJD5の135番目のGlyを介した相互作用がHBV複製に貢献していることが分かった。JMJD5は水酸化酵素活性があり、基質に水酸基を導入し蛋白質の機能を制御していることが考えられる。そこで、JMJD5の水酸化酵素活性中心である321番目のHisをAlaに置換した変異体を作製し、HBV複製への影響を調べたところ、HBxとの相互作用は維持していたが、HBV複製を支持しなかった。最後にJMJD5欠損細胞を用いてDNAマイクロアレイにより遺伝子発現の変化を検討したところ、JMJD5欠損細胞では顕著に肝臓特異的な転写因子の発現が減少していることが分かった。減少した転写因子の発現は野生型のJMJD5を発現することにより回復し、水酸化酵素活性を失くしたJMJD5では回復しなかった。

〔総　括(Conclusion)〕

本研究で、HBxと相互作用する新規の宿主蛋白質としてJMJD5を同定した。JMJD5135番目のGlyを介してHBxと相互作用し、HBV複製に関与していることが分かった。さらにJMJD5の水酸化酵素活性がHBV複製だけでなく、肝機能の維持に関与していることが分かった。これらの結果から、JMJD5の135番目のGlyを介したHBxとの相互作用を阻害できる薬剤は新規の抗HBV薬となる可能性が示唆される。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）幸脇　貴久

		(職)	氏　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	松浦善治
	副　査	大阪大学教授	山本雅裕
	副　査	大阪大学教授	上田啓次

論文審査の結果の要旨

B型肝炎ウイルス(HBV)がコードしているXタンパク質(HBx)は発癌や複製に関わっていることが報告されているが、それらの分子メカニズムは不明のままであった。申請者は免疫沈降と質量解析を用いて、HBxと相互作用する宿主タンパク質としてJMJD5を同定した。JMJD5は135番目のGlyを介してHBxと相互作用し、HBV複製に関与していることを明らかにした。さらに水酸化酵素活性を不活性化したJMJD5はHBxとの相互作用は維持していたが、HBV複製を支持しなかった。加えてJMJD5の水酸化酵素活性はHBV複製だけでなく肝機能の維持に関与していることも明らかにした。以上の結果はJMJD5とHBxの相互作用を分子生物学的手法によって詳細に解析し、JMJD5のHBV複製における重要性を示している。この研究は学位論文に値すると考える。