



Title	USP15 participates in HCV propagation through the regulation of viral RNA translation and lipid droplet formation
Author(s)	日下部, 伸治
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72564
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

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)			日下部 伸治	
論文審査担当者		(職)	氏	名
	主査	大阪大学教授	松浦 善治	
	副査	大阪大学教授	塩田 達也	
	副査	大阪大学教授	仁田 啓次	
論文審査の結果の要旨 蛋白質のユビキチン化は蛋白質翻訳後修飾の一種であり、様々な細胞機能に関与する。一方、脱ユビキチン化酵素 (DUB) はユビキチン化蛋白質からユビキチン鎖を切断する酵素である。本論文では、C型肝炎ウイルス (HCV) の増殖に関与するDUBとしてUSP15を同定し、HCV増殖に対するUSP15の機能について検討した。その結果、USP15がHCVゲノムの翻訳と感染性粒子の産生に関与することを示した。また、これまでにUSP15は自然免疫に関与することが報告されていたが、USP15欠損細胞やUSP15欠損マウスを用いた検討により、USP15は抗ウイルス免疫応答には関与しないことを明らかにした。さらに、USP15は肝細胞において脂肪滴に局在し、脂質代謝制御に関与することを示した。本論文では、USP15を標的とすることで慢性C型肝炎に対する治療薬の創出に寄与できる可能性が示されており、その成果は医学的・社会的に重要なものであると考えられる。よって、本論文は博士 (医学) の学位授与に値すると考えられる。				

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	日下部 伸治
論文題名 Title	USP15 participates in HCV propagation through the regulation of viral RNA translation and lipid droplet formation (USP15はウイルスRNAの翻訳と脂肪滴形成を制御することでC型肝炎ウイルスの増殖に関与する)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
C型肝炎ウイルス (HCV) は主にヒトの肝臓に感染し、様々な宿主因子を利用して増殖し重篤な肝疾患を引き起こす。ユビキチン化は蛋白質翻訳後修飾の一種であり、標的蛋白質の分解や細胞内のシグナル伝達を通じて様々な細胞の機能に関与する。一方、脱ユビキチン化酵素 (DUB) はユビキチン化蛋白質からユビキチン鎖を切断する。これまでHCV感染と脱ユビキチン化機構の関係についての報告は少なく、HCV感染におけるDUBの関与は不明であった。そこで、本研究ではHCV感染におけるDUBの役割を検討した。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
基質非特異的に特定のユビキチン鎖を切断するDUBである、OTUB1, OTUD1, および OTUD7BをHuh7細胞に発現させるとHCVの増殖は低下した。また、HCVゲノムが自己複製するレプリコン細胞を、非特異的DUB阻害剤であるPR-619で処理するとHCVゲノムの複製が低下することから、ユビキチン化やDUBがHCVの増殖に関与することが示唆された。そこで、各DUBに対するRNAiを用いたスクリーニングにより、HCV複製に関与するDUBとしてubiquitin-specific protease 15 (USP15) を同定した。USP15を欠損させたHuh7細胞ではHCVの増殖が抑制され、欠損細胞にUSP15を発現させるとHCVの増殖は親細胞と同程度に回復した。また、HCVのレプリコンRNAをUSP15欠損細胞に導入すると、コロニー形成数が親細胞に比べて減少し、自己複製能を消失させたレプリコンRNAをUSP15欠損細胞に導入すると、親細胞に比べてウイルスRNAの翻訳活性が低下していた。また、細胞内と細胞外のウイルスRNA量を比較してウイルス粒子の放出率を検討したところ、USP15欠損細胞ではウイルスの放出率が親株よりも低下していた。以上の成績から、USP15はHCVゲノムの翻訳と感染性粒子の産生に関与することが示唆された。次に、USP15の活性の肝臓特異性を検討するため、ヒト腎臓由来細胞株の293T細胞にHCVの感染増殖に必須な宿主因子を発現させた293T/miR-122/CLDN1/APOE細胞と、ヒト肝臓由来のHep3B細胞株にmiR-122を発現させたHep3B/miR-122細胞を用いてUSP15欠損細胞を作製した。Hep3B細胞ではHuh7細胞と同様にUSP15欠損によりHCVの増殖低下が認められたが、293T細胞ではUSP15を欠損させてもHCVの増殖やHCV RNAの翻訳活性に影響は認められなかった。以上の成績より、USP15は肝細胞特異的にHCVの増殖に関与することが示唆された。 これまでに、USP15はRIG-Iを介した自然免疫に関与することが報告されていた。そこで、USP15欠損マウスを作製しウイルス感染に対する自然免疫応答におけるUSP15の機能を検討した。USP15欠損マウスに水疱性口内炎ウイルス (VSV) を感染させたところ、野生型マウスとUSP15欠損マウスの生存率に優位な差は認められなかった。また、VSV感染時のサイトカイン誘導においても、USP15欠損によって差は認められなかったことから、USP15はRNAウイルスの感染に対する自然免疫応答に関与しないことを明らかにした。 USP15の肝細胞における局在を観察した結果、USP15は脂肪滴に局在し、USP15欠損細胞では脂肪滴の減少が観察された。また、USP15欠損細胞では脂肪酸合成の制御因子であるSREBP-1cの発現が低下しており、脂肪酸の処理によってUSP15欠損細胞におけるHCVの感染性粒子の産生が回復した。以上の成績から、USP15は肝細胞の脂肪滴形成に関与し、脂質代謝制御を介してHCVの感染性粒子の産生に関与することが示唆された。	
〔総括(Conclusion)〕	
本研究において、HCVの増殖に関与する宿主因子としてUSP15を新たに同定した。USP15は肝細胞特異的にHCVゲノムRNAの翻訳や脂肪滴形成を制御することで、HCVの感染性粒子産生に関与する。今後、肝細胞におけるUSP15の基質を同定し、HCVの感染環におけるUSP15の機能を詳細に解析することで、慢性C型肝炎に対する新しい治療薬の開発が期待される。	