

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07515

研究課題名（和文）安定化ポリメラーゼを用いた新規B型肝炎ウイルス複製系によるウイルス増殖機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of virus multiplication mechanism by a novel hepatitis B virus replication system using stabilized polymerase

研究代表者

坂口 剛正（Sakaguchi, Takemasa）

広島大学・医系科学研究科（医）・教授

研究者番号：70196070

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：B型肝炎は深刻な公衆衛生問題である。我々はB型肝炎ポリメラーゼにタグを付加すると安定化することを見出した。これを利用して、HBVのプレゲノムRNAを発現するセンダイウイルスとポリメラーゼ発現プラスミドを用いて、ゲノムDNAを増幅するシステムを開発したが、HBVの完全な複製は観察されなかった。また、HBVポリメラーゼのセンダイウイルスあるいはExpi293細胞を使った大量発現やタンパク質結晶化も達成できなかった。HBVポリメラーゼの安定化が不十分であり、本研究の成果は限定的であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SeV-pgRNAとHBVポリメラーゼを用いた系で、SeVの広い宿主域からHBVの肝由来細胞特異的増殖のための因子が明らかになると考えられる。また、これらを改変してSeVのみでHBV増殖が起こせるようになれば、免疫が正常なマウスに投与して肝炎の研究を行うことができる可能性がある。さらにHBVのポリメラーゼの立体構造の解明によって酵素としての作用メカニズムが正確に明らかになれば、ポリメラーゼを標的とした薬剤の開発に資する。

研究成果の概要（英文）：Hepatitis B is a serious public health issue. We discovered stabilization occurs when a tag is added to the Hepatitis B polymerase. Taking advantage of this, a system was developed to amplify genomic DNA using a Sendai virus expressing HBV pre-genomic RNA and a stable polymerase expression plasmid. However, complete replication of HBV was not observed. Additionally, we could not achieve mass production or protein crystallization of the HBV polymerase using either the Sendai virus vector or Expi293 cells. The stabilization of the HBV polymerase was insufficient, and thus the outcomes of our research were limited.

研究分野：ウイルス学

キーワード：B型肝炎ウイルス ポリメラーゼ センダイウイルス プレゲノムRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎は公衆衛生上の重大な問題であり、特にB型肝炎ウイルス(HBV)が引き起こす慢性感染は世界中で数億人に影響を与えている。これは、ヒトの体内で一度HBVに感染すると、感染者は一生にわたりウイルスを体内に保持し続けることを意味する。これにより肝硬変や肝臓などの重篤な健康問題を引き起こす可能性がある。それにもかかわらず、HBVの生存と増殖の詳細なメカニズムはまだ完全に理解されていない。HBVの複製プロセスは、ウイルスのプレゲノムRNA(pgRNA)を介して行われ、その後ウイルス粒子の形成と放出が行われる。これらのプロセスは、ウイルス自身のタンパク質、特にウイルスポリメラーゼと宿主細胞の機能と密接に関連している。しかし、これらの相互作用についての具体的な知識は限定的であり、研究は困難を伴ってきた。

HBVポリメラーゼ蛋白質は従来から発現させるのが困難であった。私たちは特定のタグ(tag)をポリメラーゼに付加すると培養細胞内で安定に発現することを偶然に見いだした。この安定発現ポリメラーゼを用いた薬剤スクリーニングの成果は論文でも発表されている¹⁾。

また、私たちは、これまでにセンダイウイルス(SeV)ベクターの技術を培ってきた。SeVは、複製速度がHBVに比べて大きく、広い宿主域をもっている。SeVベクターでHBVプレゲノムを発現させて、さらに安定化ポリメラーゼを供給してHBVの複製を起こすことができれば、多種類の細胞でのHBV増殖について研究することが可能になる。さらにゲノム編集の応用による持続感染細胞からのcccDNAの除去、ならびにHBVポリメラーゼの高度精製も可能であると考えられた。

2. 研究の目的

(1)センダイウイルス(SeV)ベクターを利用して、B型肝炎ウイルス(HBV)のプレゲノムRNAとポリメラーゼを発現する新しいシステムを開発する。このシステムは、ウイルスの生物学的挙動と複製プロセスを実験室で模倣し、詳細に研究するためのツールとなることを目指す。この新しいシステムを用いて、HBVの複製プロセスを解明する。具体的には、ウイルスのpgRNAとポリメラーゼがどのように相互作用し、ウイルス粒子の形成と放出にどのように関与するかを調査する。また、これらのウイルスベクターを異なる起源の細胞で使用し、HBV複製のための宿主因子を特定することも目指す。

(2)B型肝炎ウイルス(HBV)感染細胞においては、HBVのゲノムDNA(cccDNA)が核内に存在しており、CRISPR-Cas9システムによるゲノム編集技術によってこれを切断・除去する試みが進められている。本研究では、センダイウイルス(SeV)をベクターとしてCRISPR-Cas9システムを細胞に導入し、cccDNAの感染細胞からの除去ができるかどうかを研究する。

(3)マウスへの全身投与のために、SeV糖蛋白質を改変して、静脈投与によって肝細胞特異的に感染するSeVを構築する。作製したSeVによるHBV生成システム、およびCRISPR-Cas9-SeVをマウスに投与して、HBV感染に及ぼす影響を研究するためのツールとする。また、SeVを用いたpolタンパク質の大量発現を行う。

3. 研究の方法

(1)新たなHBVモデルの構築：センダイウイルス(SeV)ベクターを利用して、B型肝炎ウイルス(HBV)のプレゲノムRNAとポリメラーゼを発現するシステムを開発する。

(2)CRISPR-Cas9システムをもつSeVの構築と培養細胞でのcccDNA除去：SeVゲノムに新たな転写単位を導入し、そこにCas9遺伝子とガイドRNAを発現させる。ガイドRNAの両端にはリボザイムを付加して、細胞質で、Capとpoly Aを付加した形で合成されたRNAから、ガイドRNAが生成するように設計する。

(3)マウス肝でのSeVを利用したHBVの導入：HN蛋白質欠損によって、肝細胞指向性のSeVを作製できる可能性があるため、HN発現細胞を用いてHN欠損ウイルスを作製する。polタンパク質の大量精製と結晶化の試み：N端に3xFLAGタグを追加して安定化したHBVポリメラーゼを様々な方法で発現させ、発育鶏卵、あるいはExpi293細胞での大量発現を行い、結晶化を試みる。

4. 研究成果

(1)新たなHBVモデルの構築：SeVベクターを使用して、HBVのプレゲノムRNAとポリメラーゼを発現するシステムを初めて開発した。具体的には、2種類のHBVプレゲノム、すなわちpgRNA(本来のプレゲノムRNAの開始点から転写がはじまる)とUpRNA(pgRNAよりも上流のpreCoreの翻訳開始点上流から転写が始まる)を発現する遺伝子組換えSeVを作製した。これだけをHEp-G2細胞に単独で感染させてもHBVの増殖は見られなかったが、HBVポリメラーゼ

(pol) 発現プラスミドを導入すると、HBsAg と HBV DNA が上清に検出され、部分的には複製が行われていることが確認できた。特に UpgRNA で顕著であった。一方で、cccDNA を証明することができず、本来の意味での持続感染のモデルになるかどうか不明である。また、プラスミドで pol を供給するのではなく、pol 発現 SeV を用いる試みは成功しなかった。

(2) 治療法への応用：モデル系として培養細胞に Cas9 を発現する SeV を感染させ、さらに GFP 遺伝子を標的とする guide RNA を導入した。guide RNA の部位で RNA が切断されるとルシフェラーゼ活性がでるレポータープラスミド（広島大学 山本卓博士、佐久間哲史博士より供給）を使って活性を測定したところ、切断が検出された。また、GFP 発現細胞株を作製して、これに Cas9 発現 SeV を感染させ、さらに GFP 遺伝子を標的とする guide RNA を導入して、GFP 蛍光の減弱を観察した。

Cas9 と HBV ゲノムに対する guide RNA の両方を発現する SeV を構築した。guide RNA は両端にリボザイムを配して、細胞内で切断後に guide RNA が生成するようにデザインした。しかしながら、guide RNA 切断のレポータープラスミドでの結果は不十分な切断にとどまった。

(3) マウス肝での SeV を利用した HBV の導入：遺伝子組換え SeV をマウスに静注すると、肝臓に到達する前に赤血球が凝集する可能性があるため、これを回避する試みとして、HN タンパク質を欠損し、F タンパク質のみの粒子を作り、肝細胞のアシアロ糖タンパク質受容体を通じて肝細胞への感染を試みた。しかし、HN 欠損ウイルスの安定した製造は困難であった。これらの結果から、我々は SeV を用いたマウスでの HBV 感染試みを断念し、さらなる改善を目指すこととした。

N 端に 3xFLAG タグを追加した安定化した HBV ポリメラーゼの大量発現を、組換え SeV ベクターおよび真核細胞発現ベクターと Expi293 細胞で試みた。しかし、結晶化に十分な量のタンパク質を得ることができなかった。

以上の結果から、十分な成果を得ることはできなかったが、HBV ポリメラーゼの安定を更に高める、および SeV ベクターを改善し、将来的には HBV の予防および治療法の改善につながることを期待している。

最後に、同時に開発中の、SARS-CoV-2 を含めた多種類のウイルスに有効な広域ウイルス剤である Pin1 阻害剤について文献調査を行い、HBV 増殖阻害の可能性を示した。

< 引用文献 >

Tukamoto Y et al., PLoS One, 13 巻, 2018, e0197664

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanna M, Nakatsu Y, Yamamotoya T, Encinas J, Ito H, Okabe T, Asano T, Sakaguchi T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Roles of peptidyl prolyl isomerase Pin1 in viral propagation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Development	6. 最初と最後の頁 1005325
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.1005325	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 分 担 者	東浦 彰史 (Higashiura Akifumi) (90598129)	広島大学・医系科学研究科（医）・助教 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関