

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700466

研究課題名 (和文) バイオナノカプセルを用いた HBV 感染機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis of the infection mechanism of human hepatitis B virus using bio-nanocapsule.

研究代表者

松崎 高志 (MATSUZAKI TAKASHI)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教 (常勤)

研究者番号：90456939

研究成果の概要 (和文)：

ヒト B 型肝炎ウイルスの表面抗原 (HBsAg) L タンパク質を出芽酵母に発現させて作成した中空ナノカプセル (バイオナノカプセル：BNC) を HBV のモデルウイルスとして用い、HBV の感染機構の中で解明が遅れている膜融合機構を *in vitro* で詳細に解析した。その結果、HBsAg L タンパク質の N 末領域に新規膜融合モチーフを同定し、連続するフェニルアラニン残基が膜癒合活性の必須アミノ酸残基であることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

By using novel yeast-derived HBsAg L particles, named bio-nanocapsules (BNC), as noninfectious subviral particles, we studied the infectious mechanisms, especially the membrane fusion mechanism that remain unsolved, of HBV. We successfully identified a novel membrane fusion motif located at the N-terminal region of HBsAg L protein. We also demonstrated that the hydrophobic phenylalanine residues (Phe13 and Phe14) were essential for this fusion activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料

キーワード：ナノバイオロジー、ナノメディスン

1. 研究開始当初の背景

ヒト B 型肝炎ウイルス (HBV) は、キャリアが全世界で 4 億人以上、国内でも 100 万人に達するなど、臨床医学的に重要なウイルスであるが、その治療法は、ウイルスの増殖を抑制する逆転写酵素阻害剤に依存しており、耐性株の出現が大きな問題となっている。このため、感染阻害剤などの新規作用機序を有する治療薬の開発が急務とされるが、HBV の受容体は未同定であり、HBV のヒト肝臓特異的な感染機構、特に細胞への侵入機構は殆ど解明されていない。これは、HBV ビリオンの入手が患者血漿からのみに限定されており、また *in vitro* における HBV の感染能が不安

定かつ不十分なため、生化学的、細胞生物学的な解析が遅延していることが原因となっている。

2. 研究の目的

申請者らは、HBV の表面抗原 (HBsAg) L 蛋白質を遺伝学的に出芽酵母へ発現させて得た中空ナノ粒子 (バイオナノカプセル、BNC) に遺伝子や薬剤を封入し、生体内でヒト肝臓細胞特異的にデリバリーするシステムを開発している (Yamada et al. *Nature Biotech* 2003)。また申請者らは、BNC のヒト肝臓細胞特異性以外にも、HBV と相互作用する分子が同様に BNC とも相互作用することを見出して

おり (Kasuya et al. *FEBS J.* 2008)、BNC が HBV と同様の性状を有していることを明らかとしている。

それ故本研究では、BNC を HBV のモデルウイルス粒子として用いることで、これまで困難であった HBV の感染機構や細胞内動態を初めて *in vitro* で詳細に解析することを目的としている。

また、近年抗ウイルス薬のターゲットとして注目されているウイルスの膜融合機構に着目し、生化学的手法により HBV の膜融合機構を *in vitro* で詳細に解析することで、有効な阻害剤開発の手掛かりとなる基礎的知見を得ることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) BNC を含む膜コンパートメントの同定とプロテオーム解析

申請者はこれまでに、共焦点レーザー顕微鏡を用いた形態学的な解析から、BNC はクラスリンおよびカベオラ依存的なエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれ、細胞内でエンドソームやカベオソームとは異なる未知の膜コンパートメントに局在することを見出している。本研究では、この膜コンパートメントを生化学的に同定し、さらに BNC と特異的に結合する膜受容体の同定を試みた。

①OptiPrep 密度勾配遠心による BNC を含む膜コンパートメントの同定

BNC を取り込んだヒト肝臓 HepG2 細胞をシヨ糖等張液でホモジナイズ後、除核画分からシヨ糖遠心浮遊法により総膜画分を取得し、これを用いて iodixanol (OptiPrep) 密度勾配遠心を行なった。分離した膜コンパートメントをフラクションに回収し、オルガネラマーカー抗体および抗 HBsAg L 抗体を用いてウエスタンブロットによる解析を行い、BNC と同一フラクションに存在する膜コンパートメントを解析した。

②BNC に特異的に結合する膜タンパク質のプロテオーム解析

HepG2 細胞の膜画分をシヨ糖密遠心浮遊法によって分離し、1% NP-40 で可溶化して得られた膜タンパク質画分を、BNC をカラム樹脂に結合させて作成したアフィニティーカラムへ添加し、BNC に特異的に結合する膜タンパク質を探索した。塩およびグアニジンで溶出された結合タンパク質を SDS-PAGE により分離し、質量分析計を用いて同定した。

(2) HBV の新規膜融合モチーフの同定と必須アミノ酸残基の同定と機能解析

申請者は、蛍光エネルギー共鳴移動 (FRET) 法に基づく *in vitro* 膜融合アッセイ法

(lipid-mixing アッセイおよび leakage アッセイ) を用いた BNC の膜融合能の解析から、

HBsAg L タンパク質が高い膜融合活性

(lipid-mixing 活性および leakage 活性) を持つこと、膜融合活性には HBsAg L タンパク質の N 末端 50 アミノ酸残基が必須であることを明らかにした。本研究では、新たに合成ペプチドを表面提示するリポソームを用いた新規 *in vitro* 膜融合アッセイ法を構築し、N 末端 50 アミノ酸残基領域に存在する新規膜融合活性モチーフを同定し、その機能を生化学的に解析した。(図 1)

①ペプチド提示リポソームの作成

ニッケルキレート NTA 脂質 (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3- $\{[N(5\text{-Amino-1-Carboxypentyl})\text{iminodi Acetic Acid}]\text{Succinyl}\}$)

(DOGS-NTA-Ni) を含むリポソーム (DPPC: DOGS-NTA-Ni = 9:1) を脂質フィルム水和法によって作製した。HBsAg L タンパク質の N 末端 50 アミノ酸領域に含まれるペプチド断片をヒスチジンタグ (His6) を付加して合成し、ニッケルとのアフィニティでリポソーム表面に結合させ、ペプチド提示リポソームを作製した。

②lipid-mixing アッセイ

蛍光標識リポソーム (DPPC:Rhodamine-DHPE:NBD-PE = 94:3:6) に等量のペプチド提示リポソームを添加し、NBD-Rhodamine 間の FRET の解除に伴う NBD の蛍光強度変化を経時的に測定することにより、lipid-mixing 活性を算出した。

③Leakage アッセイ

脂質フィルム (DPPC:DPPG = 3:1) を蛍光溶液 (12.5 mM ANTS, 45 mM DPX, 100 mM Tris-HCl pH7.0, 140 mM NaCl) で水和後、凍結融解することにより蛍光内包リポソームを作成した。蛍光内包リポソームに等量のペプチド提示リポソームを添加し、DPX による消光反応の解除に伴う ANTS の蛍光強度変化を経時的に測定することにより、leakage 活性を算出した。

④ジャイアントリポソームを用いた形態学的解析

平均粒子径 10 μm の蛍光標識ジャイアントリポソーム (DOPC:DOGS-NTA-Ni:NBD-PE:Rhodamine-DHPE = 90:10:2:1) を静置水和法により作成した。顕微鏡下でペプチドを添加し、添加後のジャイアントリポソームの挙動を蛍光ライブイメージングにより観察した。

⑤ヒト赤血球を用いた Hemolysis アッセイおよび形態学的解析

輸血用濃縮ヒト赤血球 (大阪赤十字血液センター) を生理食塩水にて洗浄後、10 倍量 (V/V) に希釈し、等量の脂質量のペプチド提示リポソーム (DPPC:DOGS-NTA-Ni = 9:1) を加え溶血反応を行なった。遠心上清を 541 nm の吸光度測定でヘモグロビン量を測定し、ペプチドの溶血活性を定量化した。

形態学的解析には、等量の脂質量の蛍光標

識ペプチド提示リポソーム

(DPPC:DOGS-NTA-Ni:NBD-PE = 44:5:3)を添加し、蛍光顕微鏡にて観察を行なった。

⑥遠紫外円偏光二色性 (CD) スペクトル解析

親水性条件下でのペプチドの二次構造の解析には、超純水 (抵抗値 18.2 MΩ・cm 以上) を用いて終濃度 0.1 mg/ml に希釈した。疎水性条件下での解析には、40% trifluoroethanol (TFE) を用いて終濃度 0.1 mg/ml に希釈した。測定は、光路長 1.0 mm の石英セルを用いて、円二色分散計により CD スペクトル測定を行なった。測定により得られた楕円率 θ より平均モル残基楕円率 (θ) (deg・cm²/dmol) は以下の式により換算した。

$$(\theta) = \theta \cdot 100 / (1 \cdot c \cdot A)$$

1 は光路長 (cm)、c はタンパク質のモル濃度、A はタンパク質のアミノ酸残基数

(3) BNC のヒト肝臓細胞への侵入経路および細胞内局在の形態学的解析

BNC のヒト肝臓細胞への侵入過程 (エンドサイトーシスによる侵入過程、細胞内局在部位、および膜融合部位) を、薄切片の透過型電子顕微鏡観察による形態学的解析を試みた。

電子顕微鏡試料の作成

BNC を細胞内に取り込んだヒト肝臓初代培養細胞を 2%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒドで前固定後、1% OsO₄ で後固定した。脱水処理、アルコール置換・樹脂透徹後、樹脂封埋した。約 100 nm の薄切片を作製し、酢酸ウラニル・クエン酸鉛の電子線色を行ない、透過型電子顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

(1) BNC を含む膜コンパートメントの同定とプロテオーム解析

①OptiPrep 密度勾配遠心による BNC を含む膜コンパートメントの同定

BNC を細胞内に取り込んだヒト肝臓細胞の膜画分を iodixanol (OptiPrep) の密度勾配遠心後のフラクションを、各オルガネラマーカー抗体および抗 HBsAg L 抗体を用いてウエスタンブロットによる解析した結果、BNC の局在が広くブロードとなり、特定の膜画分に濃縮することが出来なかった。現在、BNC 内部へ直径 10 nm の鉄粉を内包させたものを用い、磁気力により BNC を含む膜画分を精製濃縮する方法へ変更し解析を進めている。

②BNC に特異的に結合する膜タンパク質のプロテオーム解析

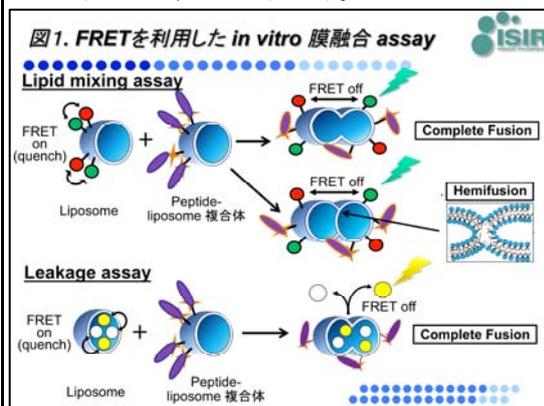
ヒト肝臓細胞の膜画分を可溶化して得られた総膜画分を、BNC を固定化して作製したアフィニティーカラムに流し、BNC に特異的に結合する膜タンパク質を探索した。その結果、塩およびグアニジンで溶出された約 45 kDa、48 kDa、55 kDa、260 kDa の 4 種の結合

蛋白質を単離した。質量分析計による解析の結果、約 55 kDa のタンパク質 (P55) が既知の膜タンパク質であることが明らかとなった。本分子はこれまでに HBV の結合因子として報告されておらず、HBV の膜受容体である可能性が考えられる。現在 HBsAg L タンパク質との結合解析を進めている。

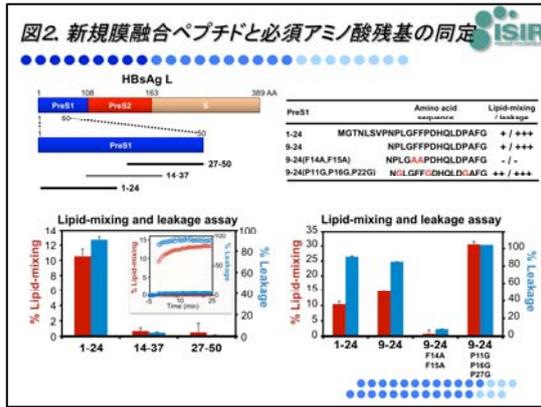
(2) HBV の新規膜融合モチーフの同定とその機能解析

①HBsAg L タンパク質の新規膜融合モチーフの同定

ニックレルキレート NTA 脂質を用いてヒスチジンタグを付加した合成ペプチドを表面に結合出来るリポソーム (ペプチド提示リポソーム) を作製し、このペプチド提示リポソームを用いた新規 *in vitro* 膜融合アッセイ (lipid-mixing アッセイおよび leakage アッセイ) を構築した (図 1)。



膜融合活性を示す HBsAg L タンパク質の N 末端 50 アミノ酸残基 PreS1 (1-50) をカバーする合成ペプチド PreS1 (1-24、14-37、27-50) をヒスチジンタグを付加して合成し、これらのペプチドを表面提示するリポソームを用いた膜融合アッセイを行なった。その結果、PreS1 (1-24) が高い膜融合活性を示すことが明らかとなった。次に、PreS1 (1-24) の N 末および C 末の欠損変異体を用いた同様の解析から、PreS1 (9-24) [NPLGFFPDHQLDPAFG] が膜融合の活性中心領域であることが明らかとなった。さらに、アラニン置換変異体を用いた解析から、連続したフェニルアラニン残基 (FF13/14) が膜融合活性に必須なアミノ酸残基であることを明らかとした (図 2)。



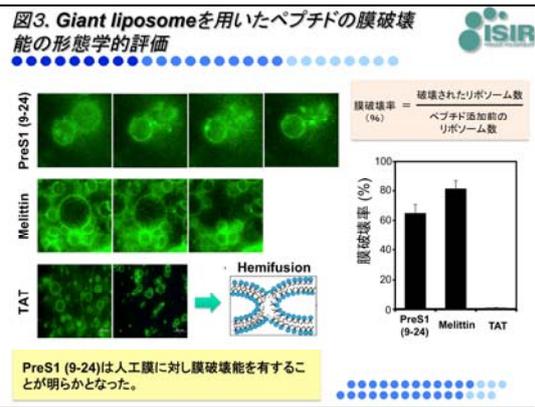
現在、FF13/14のアラニン置換変異体のウイルスを作成し、ヒト肝臓細胞への感染能を詳細に解析している。

本研究で同定したHBsAg Lタンパク質の新規膜融合モチーフPreS1(9-24)は、これまでにHBVのヒト肝臓細胞への感染に必要な領域として報告されており、未同定のヒト肝臓受容体と結合する領域と考えられてきた。しかしながら本研究によって、初めてこの領域がHBVの感染機構の膜融合に関与している可能性が示唆され、受容体との結合領域は別に存在している可能性が考えられた。このことは、これまで数十年間に渡りHBVの受容体が未同定であることの原因となっている可能性があり、本研究成果は、これまでのHBVの感染機構の理解を根本から変える極めて大きなインパクトを持つと考えられる。

また、本研究で構築したペプチド提示リポソームを用いた膜融合アッセイは、これまでのペプチドを直接添加する膜融合アッセイでは検出不可能であった、溶液中で凝集しないペプチドの膜融合活性を容易かつ正確に検出可能である。この手法を他のウイルスの膜融合解析へ応用することにより、これまで明らかとなっていない未同定の膜融合モチーフが新たに同定される可能性が考えられる。

②新規膜融合モチーフPreS1(9-24)の機能解析

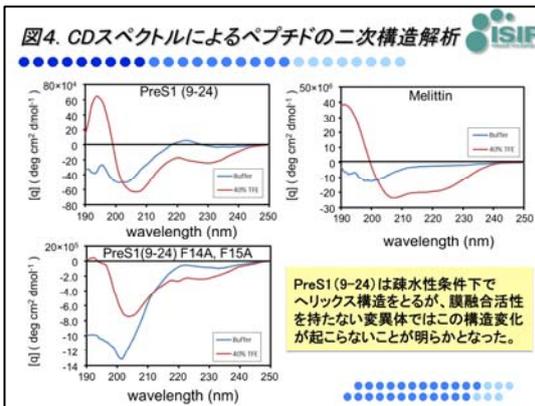
本研究で同定した新規膜融合モチーフPreS1(9-24)は、lipid-mixing 活性に比較し leakage 活性が著しく高く、類似した特徴を示すハチ毒Melittin (GIGAVLKVLTTGLPALIS WIKRKRQQ)と同様に、膜に穴を開け膜の破壊を引き起こす可能性が示唆された。そのため、蛍光標識ジャイアントリポソームを用いた形態学的解析を行なった。その結果、ペプチドの添加に伴いリポソームの破壊が多数観察され、Melittinと同等の高い膜破壊能を有していることが明らかとなった(図3)。



次に、生体膜に対する親和性および膜破壊能を検討するため、ヒト赤血球膜をモデルに用いて形態学的解析およびHemolysisアッセイを行なった。その結果、PreS1(9-24)は生体膜に対し強い親和性を示すが、膜破壊能を示さないことが明らかとなった。膜破壊能に関しては人工膜(リポソーム)での結果と異なるが、これは実験に用いたヒト赤血球が輸血用のため様々な化学処理が施されており、膜が硬化している可能性が考えられた。現在、新鮮ヒト赤血球を用いて再度検討を行っている。

③新規膜融合モチーフPreS1(9-24)の構造解析

遠紫外円偏光二色性(CD)スペクトル法を用いてPreS1(9-24)の二次構造解析を行なった。その結果、40% TFE存在下の疎水性条件において、 α -helix構造の割合が増加することが明らかとなった(図4)。このような構造変化は、膜融合活性を示さないアミノ酸置換変異型ペプチドのPreS1(9-24: F14A, F15A)では見られないことから、ペプチドの構造変化が膜融合活性(膜破壊活性)の発現に重要と推定された(図4)。



(3) BNCのヒト肝臓細胞への侵入経路および細胞内局在の形態学的解析

BNCのヒト肝臓細胞への侵入過程(エンドサイトーシスによる侵入過程、細胞内局在部位、および膜融合部位)を、薄片の透過型電子顕微鏡観察による形態学的解析を試み

た。その結果、BNCと予想される膜構造物を細胞内に検出することができたが、免疫電顕に使用可能な抗体が入手できなかったため、その構造物をBNCと同定するに至らなかった。

5. 代表的な研究成果

〔学会発表〕(計1件)

①土田翔太、松崎高志、谷澤克行

“ヒトB型肝炎ウイルス帳面抗原Lタンパク質における新規膜融合モチーフの同定と生化学的解析”

第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学学会大会合同大会, 2010, 神戸ポートアイランド(口頭発表12月8日・ポスター発表12月7日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 高志

大阪大学・産業科学研究所・特任助教(常勤)

研究者番号: 90456939

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし