

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590563

研究課題名(和文) 酵母発現HBV粒子を用いた細胞表面結合蛋白質の探索

研究課題名(英文) Isolation of cell surface molecules responsible for binding with Hepatitis B virus

研究代表者

鈴木 亮介 (Suzuki, Ryosuke)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：50342902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：組換え酵母由来のB型肝炎ウイルス(HBV)粒子を用い、この粒子が結合する細胞と結合しない細胞を見いだした。SILAC法を用いて、この細胞間で発現レベルの異なる細胞表面蛋白質を同定し、これらのsiRNAをウイルス粒子が結合する細胞に導入し、ウイルス粒子の結合を減弱させる遺伝子としてScavenger receptor class B member 1 (SRB1)を同定した。しかしながらHBV感染感受性細胞においてSRB1をノックダウンあるいはノックアウトさせても、HBVの感染抑制効果は認められなかった。従ってSRB1は、HBVの感染初期過程には関与していないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cell surface molecules responsible for binding with Hepatitis B virus (HBV) were examined using yeast-derived recombinant HBV particles. The viral particles are composed of L protein, which is indispensable for viral entry. Several human-derived cell lines were examined for binding with the particle. Using the Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC) method, we identified candidates of cell surface molecules for interaction with the viral particle. Following by siRNA screening, Scavenger receptor class B member 1 (SRB1) was identified as a binding molecule for the viral particles. However, knockdown or knockout of SRB1 in sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)-expressing HepG2 had no effect on HBV infection. These results strongly suggest that SRB1 is not associated with HBV entry. Further research is needed, but with a different approach.

研究分野：ウイルス学

キーワード：B型肝炎ウイルス 細胞表面蛋白質

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎はヘパドナウイルス科 (Hepadnaviridae) に属するB型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) の感染によって引き起こされる。現在、世界ではHBV感染者が20億人、持続感染者は約3億5千万人に上ると推定されている。HBVに対する効果的で安全性の高いワクチンは存在するが、治療薬にはその効果や耐性ウイルスの出現等、改良の余地があると考えられている。

1963年にHBVが同定され、さらに1979年にはウイルスゲノムがクローニングされた事により、HBV研究は飛躍的に発展を遂げた。しかしながら現在でも効率の良い培養細胞増殖系の確立には至っていないため、HBVの生活環には未だ不明な点が多く残されている。中でもウイルス感染初期過程に重要な細胞表面受容体については、様々なグループから多数の報告があるものの、依然として決定的な分子の同定には至っていない状況である。

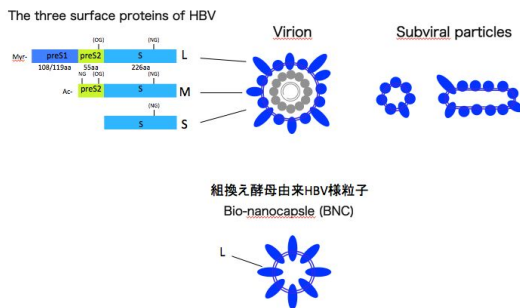
HBVの外皮蛋白質はL蛋白質、M蛋白質、S蛋白質の3種類が存在する。患者血清や培養細胞由来のHBVは、これら3種類の蛋白質が混在しており、また感染性を有する粒子以外にも様々な形態の非感染性粒子が多数存在する事も、HBVレセプターの同定を阻む要因の1つと考えられる。3種類の外皮蛋白質の中でもL蛋白質のN末端領域は、HBVのヒト肝細胞への特異性と感染性に重要である事が示されており、感染性粒子はL蛋白質を含んでいる事が知られている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HBVが肝細胞に感染する際の初期過程に重要な細胞表面の結合受容体分子を同定する事により、HBVの感染メカニズムを明らかにする事である。ウイルスの細胞表面結合受容体分子を同定する事により、培養細胞を用いた効率の良いウイルス感染増殖系の確立、さらには抗ウイルス薬の開発に繋がる事が期待される。

3. 研究の方法

(1) 組換え酵母を用いてHBVのL蛋白質を発現させ、HBV粒子 (Bio-nanocapsule; BNC) の精製を行った。



(2) HepG2細胞、Huh7細胞、FLC4細胞、FLC5

細胞、Alexander細胞、またはこれらのサブクローン等様々なヒト肝臓由来細胞株とその他の各種細胞株について、BNC粒子の結合能をフローサイトメーターを用いて定量的に解析する実験条件を至適化し、結合能の違いを解析した。

(3) 以下の方法を用い、HBV粒子の結合に関与する細胞表面分子の同定を行なった。

HBV粒子が最も良く結合する培養細胞および結合しない培養細胞それぞれを異なる安定同位体標識アミノ酸含有培地で培養した後に細胞表面蛋白質をビオチン標識し、ビオチン化蛋白質を精製した。

精製細胞表面蛋白質を質量分析法により同定し、両者で発現レベルの異なる蛋白質を明らかにした。

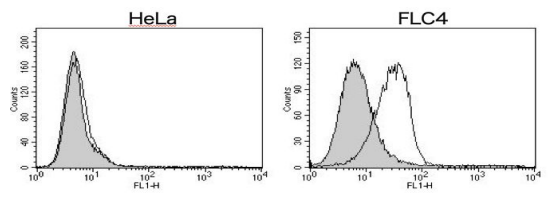
HBV粒子が結合する細胞において、上記蛋白質の遺伝子をsiRNAでノックダウンさせ、粒子の結合が減弱する遺伝子を同定した。

(4) 培養細胞を用いたHBV感染実験系において、siRNA等を用いて同定された分子のウイルス感染への関与について検討を行った。

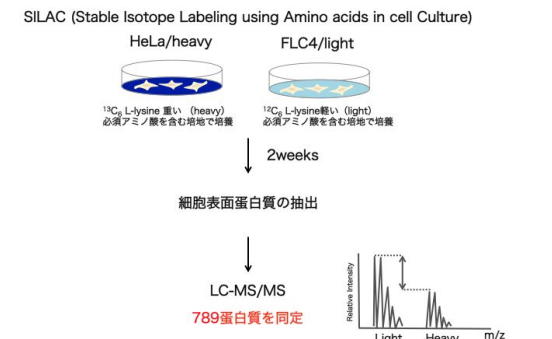
4. 研究成果

(1) 組換え酵母を用いてHBVのL蛋白質を発現させ、組換えHBV粒子 (BNC) を精製した。

(2) HepG2細胞、Huh7細胞、FLC4細胞、FLC5細胞、Alexander細胞、またはこれらのサブクローン等様々なヒト肝臓由来細胞株とその他の各種細胞株について、BNC粒子との結合能をフローサイトメーターを用いて調べた。粒子が最も結合した細胞はヒト肝臓由来のFLC4細胞であった。一方、調べた中ではヒト由来のHeLa細胞が最も粒子が結合しない細胞であった。



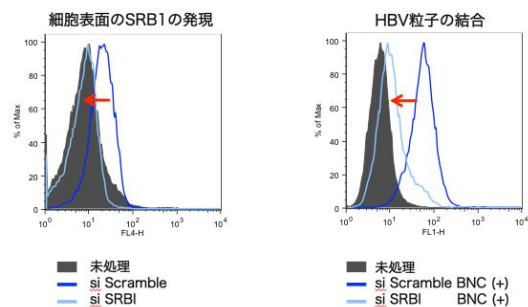
(3) ウイルス粒子が結合するFLC4細胞とほとんど結合しないHeLa細胞について、それぞれ異なる安定同位体標識アミノ酸含有培地で培養した後に細胞表面蛋白質をビオチン標識し、精製を行った。



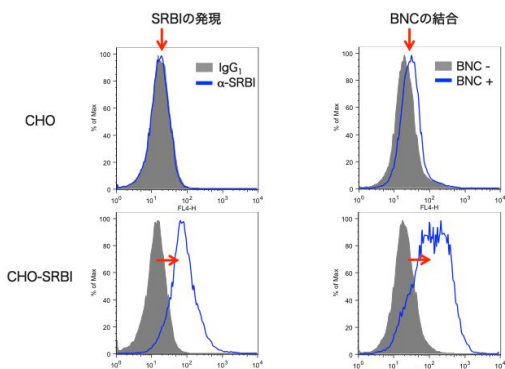
(4) 質量分析法を用い、2種類の細胞間で発現レベルの異なる細胞表面蛋白質を同定した。

(5) 同定した各蛋白質の発現を siRNA を用いて抑制させ、ウイルス粒子の結合が変化する遺伝子を探索した。

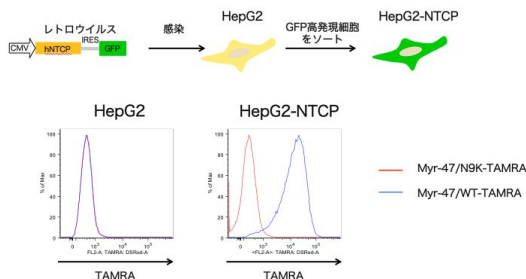
(6) ウイルス粒子の結合を減弱させる遺伝子として Scavenger receptor class B member 1 (SRB1) が同定された。



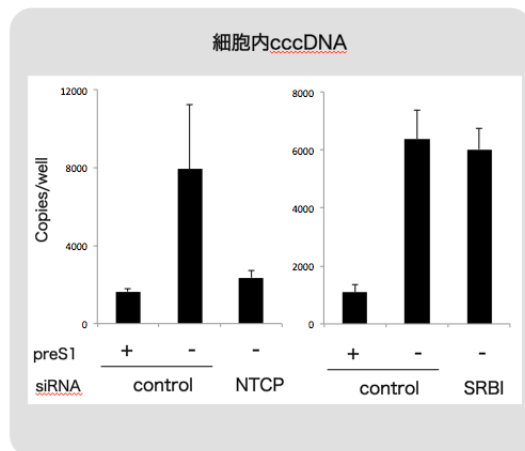
SRB1 を粒子が結合しないCHO細胞に発現させると、組換え HBV 粒子が結合した。さらにヒト HBV キャリアの血清より精製した HBs 粒子も、SRB1 の発現により細胞表面への結合が観察された。



(7) SRB1 の HBV 感染過程への関与を明らかにするため、最近、HBV の感染レセプターとして報告された Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) を発現する HepG2 細胞を作製し、HBV 感染感受性細胞を樹立した。



(8) この HBV 感染感受性細胞の SRB1 を siRNA を用いてノックダウンさせたが HBV の感染抑制は認められなかった。



(9) さらに HBV 感染感受性細胞の SRB1 を CRISPR-Cas9 システムを用いてノックアウトさせたが、HBV の感染抑制は認められなかった。従って本研究で同定した SRB1 は、HBV の感染初期過程には関与していないと考えられた。

(10) HBV 感染において SRB1 の関与が認められなかったが、HBV の生活環において、感染以外における SRB1 の生物学的意義を今後明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusuhara H, Wakita T. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem Biophys Res Commun.* 443:808-813 (2014). doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.052.

〔学会発表〕(計 1件)

遺伝子組換え酵母由来 B 型肝炎ウイルス様粒子の細胞表面への結合に関する宿主因子の解析. 松田麻未, 鈴木亮介, 嵯峨涼平, 藤本 陽, 渡士幸一, 相崎英樹, 森石 恆司, 岡本 徹, 松浦善治, 黒田俊二, 脇田隆字. 日本ウイルス学会第 62 回学術集会, 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木亮介 (Ryosuke SUZUKI)
国立感染症研究所 ウイルス第二部
主任研究官
研究者番号: 8260399924

(2) 研究分担者

黒田俊一 (Shun'ichi KURODA)
大阪大学 産業科学研究所 教授
研究者番号: 1390194420

(3) 研究協力者

松田麻未 (Mami Matsuda)
国立感染症研究所 ウイルス第二部
協力研究員

(4) 研究協力者

嵯峨涼平 (Ryohei Saga)
国立感染症研究所 ウイルス第二部
研究生