

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18866

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルスの感染機構の構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis for hepatitis B virus infection

研究代表者

横川 真梨子 (Yokogawa, Mariko)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・助教

研究者番号：60648020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)の感染により発症する慢性B型肝炎は、肝癌や肝硬変のリスク因子である。現在の治療薬は核酸アナログとインターフェロンのみであり、ウイルスを排除できないことが問題である。そこで本研究では、HBV感染の構造メカニズムを明らかにし、治療薬創製の構造基盤を得ることを目指した。

感染に重要なHBVの外殻タンパク質であるpreS、preS1、preS2の大量調製法を確立し、NMRシグナルの帰属を行うことで、HBV受容体であるNTCPとの相互作用解析の準備が整った。NTCPは大腸菌での発現に成功した。

研究成果の概要(英文)：Chronic hepatitis B is a global health problem caused by the hepatitis B virus (HBV) infection, which leads to liver cancer and liver cirrhosis. There are two types of drugs for the treatment of HBV infection: nucleotide analogue and interferon. However, these drugs can hardly eliminate HBV completely from the infected cells. Aim of this study was to obtain structural basis for HBV infection useful for the treatment of HBV infection.

The preS, preS1, and preS2 regions of the surface protein of HBV, which are important for infection, were prepared in large quantities for structural analyses. Assignments of NMR signals derived from preS, preS1, and preS2 were successfully established, which can be used for residue specific analyses of the interaction with NTCP, the HBV receptor specifically expressed in liver. After the examination of some expression vectors, E. coli expression of NTCP was achieved.

研究分野：構造生物学

キーワード：HBV 溶液NMR

## 1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) は、B型肝炎を引き起こす DNA ウイルスである。全世界には 20 億人の HBV 感染患者がいるが、これまでは適切な *in vitro* 感染実験系がなかったため、HBV 感染の分子機構に基づく治療薬開発が困難であった。近年、肝細胞に特異的に発現している Na<sup>+</sup>・胆汁酸トランスポーターである NTCP が HBV の受容体であることが明らかにされ、*in vitro* 感染実験系の構築が可能となった。これまでに、NTCP に作用して HBV の侵入を阻害する化合物が、HBV 感染の阻害に有効であることが示されている。したがって、HBV が NTCP を介して肝細胞へ侵入する構造機構を明らかにすることは、B型肝炎の治療薬開発に有用である。

肝細胞への感染に重要な HBV の外殻タンパク質 L は、N 末端側にウイルス粒子表面に露出した preS 領域、C 末端側に 4 回膜貫通領域からなる S ドメインを持つ。PreS 領域はさらに、N 末端側 107 残基の preS1 領域と C 末端側 55 残基の preS2 領域に分けられ、NTCP との結合には、preS1 領域、および preS1 の N 末端がミリスチル化されることが重要であると報告されている。これまでに、preS1 単独では特定の立体構造をとっていないという報告があるものの、ミリスチル基が付加された preS1 の立体構造や NTCP 結合時の立体構造、外殻タンパク質 L 全長の立体構造は不明である。一方、HBV 受容体である NTCP についても、7-9 回膜貫通領域を持つ膜タンパク質であること、ダイマーを形成することなどが報告されているが、精緻な立体構造は得られていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、HBV の外殻タンパク質と NTCP の相互作用様式、および NTCP との結合により引き起こされる HBV の肝細胞侵入機構を原子分解能で明らかとすることを旨とする。得られた情報に基づき、HBV と NTCP の相互作用や HBV の肝細胞への侵入に重要な相互作用を阻害する分子を設計することで、B型肝炎に対する新たな創薬戦略を構築する。

## 3. 研究の方法

### (1) HBV の外殻タンパク質の調製

HBV 外殻タンパク質 L および S ドメイン、preS、preS1、preS2 の各領域について、大腸菌を用いた大量発現系の確立を試みた。NTCP との相互作用に重要な preS1、および preS2、preS 領域については大量調製プロトコルを確立し、安定同位体標識を行い、NMR シグナルを帰属した。また、肝細胞への感染に重要な N 末端のミリスチル基を preS1 に *in vitro* で付加する調製手法を確立し、ミリスチル化 preS1 (myr-preS1) の NMR 解析を行った。

### (2) NTCP の調製

大腸菌発現系を用いた NTCP の発現および

精製法の確立を試みた。

## 4. 研究成果

膜貫通領域を含む HBV の外殻タンパク質 L 全長、S ドメインは、大腸菌での発現を確認した。感染時にウイルス表面に露出している preS、preS1、preS2 は大腸菌での大量調製プロトコルを確立し、LB 培地 1 L 培養あたり約 1 mg 以上の収量で得ることに成功した。均一 <sup>15</sup>N 標識体を調製し、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルを比較したところ、preS で観測されたシグナルは、preS1 と preS2 のいずれかのシグナルとよく重なった。PreS は preS1 と preS2 が連結したものである。いずれも、<sup>1</sup>H の化学シフト値が狭い分布を示したことから、preS は単独では特定の立体構造を形成していないことが分かった。そこで、<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N で均一に安定同位体標識を行った preS1 と preS2 を調製し、各種三重共鳴測定を行い、主鎖 NMR シグナルの帰属を完了した。この帰属を preS に移行することで、preS の帰属を行った。Myr-preS1 は、精製した preS1 とミリスチル CoA を混合し、ミリスチル基転移酵素を *in vitro* にて反応させることで調製した。ミリスチル基転移酵素は大腸菌発現系を用いて調製した。Myr-preS1 は水溶性が低下していたため、界面活性剤である n-ドデシル-β-D-マルトシド (DDM) に溶解して NMR 解析を行った。ミリスチル化していない preS1 は DDM を添加しても <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルにシグナルの線幅以上の化学シフト変化は観測されなかった一方で、myr-preS1 は多くのシグナルが、DDM 存在下の preS1 のスペクトルと異なる化学シフト値を示した。帰属と照らし合わせると、残基番号 79-108 は myr-preS1 と preS1 の化学シフト値がよく一致したが、その他の領域 (残基番号 2-77) のシグナルの大部分は、myr-preS1 において広幅化または化学シフト値が変化したために、preS1 と同じ化学シフト値にシグナルが観測されていないことが分かった。このことは、残基番号 2-77 が DDM と相互作用していることを示し、myr-preS1 はこの領域を用いて細胞膜に結合することが示唆された。以上により、preS1 を中心とする HBV の外殻タンパク質について、NTCP との相互作用解析に向けた準備が整った。

一方、NTCP は大腸菌での発現に成功したが、収量と精製純度が十分でない。現在、界面活性剤の検討による可溶化条件の最適化などを行い、精製法の確立を進めている。また、先行報告のある大腸菌由来の無細胞発現系の確立にも着手しており、問題点の解決に取り組んでいる。

## 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 7 件)

Sawazaki R., Imai S., Yokogawa M.,

Hosoda N., Hoshino S.I., Mio M., Mio K., Shimada I., and Osawa M.  
Characterization of the multimeric structure of poly(A)-binding protein on a poly(A) tail.  
Sci. Rep., 8(1), 1455 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-19659-6. 査読有  
Toyama Y., Kano H., Mase Y., Yokogawa M., Osawa M., and Shimada I.  
Structural basis for the ethanol action on G-protein activated inwardly rectifying potassium channel 1 revealed by NMR spectroscopy. 査読有  
PNAS., 115(15), 3858-3863 (2018). DOI: 10.1073/pnas.1722257115.  
Toyama Y., Mase Y., Kano H., Yokogawa M., Osawa M., and Shimada I.  
Nuclear Magnetic Resonance Approaches for Characterizing Protein-Protein Interactions." Methods Mol. Biol., 1684, 115-128, (2018). DOI: 10.1007/978-1-4939-7362-0\_10 査読有  
Toyama Y., Kano H., Mase Y., Yokogawa M., Osawa M., and Shimada I.  
Dynamic regulation of GDP binding to G proteins revealed by magnetic field-dependent NMR relaxation analyses.  
Nat. Commun., 8, 14523 (2017). DOI: 10.1038/ncomms14523. 査読有  
Yokogawa M., Tsushima T., Noda N.N., Kumeta H., Enokizono Y., Yamashita K., Standley D.M., Takeuchi O., Akira S., and Inagaki F.  
Structural basis for the regulation of enzymatic activity of Regnase-1 by domain-domain interactions.  
Sci. Rep. 6, 22324 (2016). DOI: 10.1038/srep22324. 査読有  
Kobashigawa Y., Amano S., Yoza K., Himeno R., Amemiya S., Morioka H., Yokogawa M., Kumeta H., Schlessinger J., and Inagaki F.  
Nuclear magnetic resonance analysis of the conformational state of cancer mutant of fibroblast growth factor receptor 1 tyrosine kinase domain.  
Genes Cells, 21(4), 350-357 (2016). DOI: 10.1111/gtc.12345. 査読有  
Toyama Y., Osawa M., Yokogawa M., and Shimada I.  
NMR Method for Characterizing Microsecond-to-Millisecond Chemical Exchanges Utilizing Differential Multiple-Quantum Relaxation in High Molecular Weight Proteins.  
J. Am. Chem. Soc. 138(7), 2302-2311 (2016). DOI: 10.1021/jacs.5b12954 査読有

[学会発表](計 17 件)

横川 真梨子、石場 智彬、池田 寿子、藤田 浩平、横田 旭美、大澤 匡範  
B型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解明  
日本薬学会 第138年会、2018年3月25日~28日、石川県立音楽堂、金沢市アートホール、ANAクラウンプラザホテル金沢他(石川県金沢市)  
松村 一輝、築瀬 尚美、秋元 まどか、岩崎 菜々美、坂本 多穂、黒川 洵子、横川 真梨子、大澤 匡範  
電位依存性カリウムイオンチャネル hERGの閉状態の安定化による、hERG 開閉機構の構造生物学的解明  
日本薬学会 第138年会、2018年3月25日~28日、石川県立音楽堂、金沢市アートホール、ANAクラウンプラザホテル金沢他(石川県金沢市)  
横川 真梨子、石場 智彬、池田 寿子、藤田 浩平、横田 旭美、大澤 匡範  
B型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解明  
2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月6日~9日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)  
沢崎 綾一、今井 駿輔、横川 真梨子、細田 直、星野 真一、三尾 和弘、三尾 宗代、嶋田 一夫、大澤 匡範  
ポリA上のPABP多量体による翻訳調節メカニズムの解明  
2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月6日~9日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)  
松葉 広昭、横川 真梨子、木村 友美、望月 綾野、川鍋 陽、岡村 康司、嶋田 一夫、大澤 匡範  
電位依存性プロトンチャネル VSOP/Hv1のアラキドン酸による活性化促進機構の解明  
2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月6日~9日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)  
外山 侑樹、加納 花穂、間瀬 瑤子、横川 真梨子、大澤 匡範、嶋田 一夫  
緩和速度の磁場依存性解析によるGタンパク質へのGDP結合の動的制御機構の解明  
第56回NMR討論会、2017年11月14日~16日、首都大学東京(東京都八王子市)  
Hanaho Kano, Yuki Toyama, Yoko Mase, Mariko Yokogawa, Masanori Osawa, Ichio Shimada  
Dynamic regulation of GDP binding to G proteins revealed by magnetic field-dependent NMR relaxation analyses  
2017 Taiwan-Japan Biomedical Symposium on Magnetic Resonance、2017年10月15日~17日、National Cheng Kung University (Taiwan)  
石場 智彬、横川 真梨子、横田 旭美、

室井 大輝、大澤 匡範  
B 型肝炎ウイルスの感染メカニズムの構造生物学的解析

第 61 回日本薬学会関東支部大会、2017 年 9 月 16 日、慶應義塾大学（東京都港区）  
寒河江 彪流、横川 真梨子、沢崎 綾一、細田 直、星野 真一、大澤 匡範  
Paip2 による翻訳抑制機構の構造生物学的解析

第 61 回日本薬学会関東支部大会、2017 年 9 月 16 日、慶應義塾大学（東京都港区）  
加納 花穂、外山 侑樹、岩橋 優太、間瀬 瑤子、横川 真梨子、大澤 匡範、嶋田 一夫

G タンパク質のファミリー選択的な K<sup>+</sup>チャンネル活性制御機構の解明

第 17 回日本蛋白質科学会年会、2017 年 6 月 20 日～22 日、仙台国際センター（宮城県仙台市）

Yuki Toyama, Hanaho Kano, Yoko Mase, Mariko Yokogawa, Masanori Osawa, Ichio Shimada

Dynamic regulation of GDP binding to G proteins revealed by magnetic field-dependent NMR relaxation analyses

ENC 2017 - 58th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference、2017 年 3 月 26 日～31 日、Asilomar, California (USA)

外山 侑樹、加納 花穂、間瀬 瑤子、横川 真梨子、大澤 匡範、嶋田 一夫

高分子量タンパク質の機能的運動性を解明するための多量子 NMR 解析法の開発と応用

第 54 回日本生物物理学会、2016 年 11 月 25 日～27 日、つくば国際会議場（茨城県つくば市）

Mariko Yokogawa, Takashi Tsushima, Nobuo N Noda, Hiroyuki Kumeta, Yoshiaki Enokizono, Kazuo Yamashita, Daron M Standley, Osamu Takeuchi, Shizuo Akira, Fuyuhiko Inagaki

Structural basis for the regulation of enzymatic activity of Regnase1 by domain-domain interactions

第 42 回 内藤コンファレンス、2016 年 10 月 4 日～7 日、シャトラーゼガトーキングダムサッポロ（北海道札幌市）

Mariko Yokogawa, Takashi Tsushima, Nobuo N Noda, Hiroyuki Kumeta, Yoshiaki Enokizono, Kazuo Yamashita, Daron M Standley, Osamu Takeuchi, Shizuo Akira, Fuyuhiko Inagaki

Structural Basis for the Regulation of Enzymatic Activity of Regnase-1 by Domain-Domain Interactions

The 27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems、2016 年 8 月 21 日～26 日、国立

京都国際会館（京都府京都市）  
Ryoichi Sawazaki, Shunsuke Imai, Mariko Yokogawa, Yoko Usui, Takeru Sagae, Shin-ichi Hoshino, Ichio Shimada, Masanori Osawa

Structural Characterization of PABP Multimerization on Poly(A) Tail

The 27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems、2016 年 8 月 21 日～26 日、国立京都国際会館（京都府京都市）

Yuki Toyama, Masanori Osawa, Mariko Yokogawa, Ichio Shimada

NMR method for characterizing microsecond-to-millisecond chemical exchanges utilizing differential multiple-quantum relaxation in high molecular weight proteins

The 27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems、2016 年 8 月 21 日～26 日、国立京都国際会館（京都府京都市）

外山 侑樹、大澤 匡範、横川 真梨子、嶋田 一夫

NMR method for characterizing microsecond-to-millisecond chemical exchanges utilizing differential multiple-quantum relaxation in high molecular weight proteins

第 16 回 東京大学生命科学シンポジウム、2016 年 4 月 23 日、東京大学（東京都文京区）

〔その他〕

ホームページ

慶應義塾大学・薬学部 生命機能物理学講座  
<http://square.umin.ac.jp/keio-skb/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横川 真梨子 (YOKOGAWA, Mariko)

慶應義塾大学・薬学部・助教

研究者番号：60648020