

令和元年5月30日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19137

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルスプレゲノムRNAスプライシングの意義解明

研究課題名(英文) Functional role of pregenomic RNA splicing in Hepatitis B virus replication

研究代表者

中島 謙治 (Nakashima, Kenji)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：50633806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)の複製中間体であるpregenomic (pg)RNAがスプライシングを受けることは知られていたが、その意義は長く不明であった。本研究ではスプライシングを受けたpgRNAから新規のタンパク質「Hbc-delC:HbcのC末端システインが欠損したもの」が翻訳されることを見出した。さらにそのHbc-delCはHBVヌクレオカプシドに含まれており、ウイルスの感染性に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スプライシングを受けたHBV pgRNAから、これまでに知られていなかったウイルスタンパク質が作られていることが明らかとなった。さらに、この新規タンパク質がウイルス粒子に含まれており、さらには感染性に関わっていることを示唆する結果が得られた。この結果はこれまで考えられていたB型肝炎ウイルスの構造に関する理解を覆す可能性があることを示している。またHBV pgRNAのスプライシングを標的とした新たな治療法の開発が可能となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The splicing of hepatitis B virus (HBV) pregenomic (pg)RNA is common event in HBV life cycle. However, the functional role of pgRNA splicing remains a critical unanswered question. In this study, we found that Hbc lacking its C-terminal Cys (Hbc-delC) is translated from the major type of the spliced RNA (Sp1) and that Hbc-delC is involved in HBV nucleocapsid. Furthermore, it is highly likely that co-existence of two types of Hbc proteins produced from unspliced pgRNA and from spliced pgRNA (Sp1) is important for HBV infectivity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：B型肝炎ウイルス スプライシング ヌクレオカプシド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) B型肝炎ウイルス(HBV)の複製過程において、その複製中間体プレゲノムRNA(pgRNA)の一部がスプライシングを受けることはよく知られている。また臨床研究において、そのpgRNAスプライシング比率は肝炎や発がんといった病態と正に相関することが知られている。しかしながら複製中間体pgRNAスプライシングのHBV複製や病原性発現における役割は全くと言ってよいほど不明なままであった。

(2) HBVpgRNAスプライシングは全てのHBV遺伝子型において保存されており、HBV複製あるいは病態発現に関与していることが強く推定され、新たな治療標的となりうることが期待されるが、pgRNAスプライシングのHBV複製における意義が不明では、「より抗ウイルス効果を発揮するためにはpgRNAスプライシング効率を亢進・抑制どちらに制御すべきか？」が分からない。その方向性を見極めるためにも、本研究によってpgRNAスプライシングがHBV複製や病態発現にどのように関わっているかを明らかにすることが重要と考えられた。

2. 研究の目的

pgRNAのスプライシング及びspliced pgRNA産物が、HBVの遺伝子発現・複製、粒子形成にどのように関与するのかを明らかにするために、スプライシング部位への変異体などを用いて解析を行った。これらが明らかにされることによりHBVの生活環を制御する分子機構の理解が進むだけでなく、B型肝炎治療薬の新たな標的基盤創出が期待される。

3. 研究の方法

(1) HBVゲノム1.24倍長(野生型およびスプライシング欠損株)を持ったプラスミドを一過性に培養細胞に導入する系において、上清のHBe、HBs抗原をCLIA法で、上清のHBs及び細胞のHBs、HBc抗原をウェスタンブロットで、また細胞のHBs、HBc抗原を免疫染色で検出した。上清に放出されたウイルス粒子の測定方法としては、ポリエチレングリコール沈殿後DNase耐性HBVゲノム量を測定した。

(2) HBcタンパク質の多量体化を評価するために、ウイルス複製細胞可溶化液に銅イオンを添加することでHBc分子間の結合を促進させたのち非還元SDS-PAGE、ウェスタンブロットによりHBc多量体形成能を評価した。また、native agarose電気泳動、ウェスタンブロットを用いてヌクレオカプシド形成を評価した。

(3) スプライシング欠損株の感染性を評価するためには、レポーターとしてルシフェラーゼ遺伝子を搭載したHBVゲノムを内包したHBV粒子を感染させる系を用いた。このウイルス粒子産生のために、レポーター搭載HBVゲノムと共に、構造タンパク質供給用としてパッケージングシグナルを欠損したHBVゲノム(野生型あるいはスプライシング欠損株)を共発現させるトランスパッケージングシステムを用いた。

4. 研究成果

(1) HBV複製におけるspliced pgRNAの存在意義について

野生型HBVと比較してスプライシング欠損変異体を導入した細胞におけるHBcタンパク質発現が低かった。このことからスプライシングを受けたpgRNAはHBcタンパク質の産生あるいは安定化に関与していることが示唆された。spliced pgRNAの配列からは「C末端のシステインが欠損したHBcタンパク質:HBc-delC」が翻訳されることが予想されたので、SH基修飾剤をもちいたSDS-PAGE、ウェスタンブロットを行ったところ、HBV複製細胞においてHBcだけでなく、HBc-delC(新規タンパク質)がHBcタンパク質と同程度発現していることが明らかとなった。

(2) HBc-delCのカプシド形成における役割

HBcタンパク質はウイルス粒子のカプシド(殻)を構成するとされていることから、HBc-delCもカプシド形成に関与していることが考えられた。そこでまずは、細胞可溶化液に銅イオンを添加することによる酸化刺激でHBc多量体形成を評価したところ、HBcおよびHBc-delC両者の存在が多量体形成に重要であることが明らかとなった。またHBc-delCのみが存在している条件では2量体までしか形成されなかった。しかしながらウイルスゲノム導入細胞の上清におけるDNase耐性HBVゲノムDNA量(カプシドに内包されたHBVDNAに相当すると考えられる)を評価した実験では、スプライシング欠損変異型においても野生型と同等のゲノムDNAが検出された。このことからpgRNAスプライシング(HBc-delCの存在)はHBVウイルス粒子形成に関して量的には大きな影響はない可能性が示唆された。

(3) HBc-delCの存在がHBV粒子感染性におよぼす影響について

トランスパッケージングシステムによって作成したレポーター搭載ウイルス(野生型およびスプライシング変異型)の感染実験において、野生型に比べスプライシング欠損ウイルスは50%程度感染性が低いことが明らかとなった。接種したHBVDNA量は同じであることから、両ウイルス(野生型と変異型)は質的に異なっていると考えられた。解析に用いたレポーター搭載

ノムには違いがないことから、感染性の違いは粒子の構成成分（特にカプシド）の違いに起因すると考えられ、ウイルス粒子の細胞への接着からレポーター遺伝子発現に至るまでの間のステップに影響していると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Ito N, Nakashima K, Sun S, Ito M, Suzuki T.
Cell type diversity in hepatitis B virus RNA splicing and its regulation. *Frontiers in Microbiology* 10:207, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.00207. eCollection 2019.

Sun S, Nakashima K, Ito M, Li Y, Chida T, Takahashi H, Watashi K, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of PUF60 in Transcriptional and Post-transcriptional Regulation of Hepatitis B Virus Pregenomic RNA Expression. *Scientific Reports* 7(1):12874, 2017 doi: 10.1038/s41598-017-12497-y.

Li Y, Ito M, Sun S, Chida T, Nakashima K, Suzuki T. LUC7L3/CROP inhibits replication of hepatitis B virus via suppressing enhancer II/basal core promoter activity *Scientific Reports* 18(6): 36741, 2016 doi: 10.1038/srep36741.

〔学会発表〕(計 5 件)

Regulation of HBV pregenomic RNA splicing
Kenji Nakashima, Noriomi Ito, Masahiko Ito, Tetsuro Suzuki
The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology
2018-10-28

Identification of positive regulators of HBV pregenomic RNA expression that bind to the post-transcriptional element of the viral RNA
Kenji Nakashima, Masahiko Ito, Suofeng Sun, Tetsuro Suzuki
The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology
Osaka, Japan
2017-10-25

Involvement of the spliced RNA-encoded HBc lacking its C-terminal cysteine in the viral capsid assembly
Nakashima K, Ito M, Suzuki T.
第 64 回日本ウイルス学会学術集会
札幌
2016-10-23

PUF60: a versatile regulator of hepatitis B virus replication
Sun S, Nakashima K, Ito M, Suzuki T.
第 64 回日本ウイルス学会学術集会
札幌
2016-10-23

Involvement of the spliced RNA-encoded HBc lacking its C-terminal cysteine in the viral capsid assembly
Nakashima K, Ito M, Suzuki T.
2016 International HBV meeting
Seoul, Korea
2016-09-21

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況（計 1 件）

名称：肝炎組織体、肝炎ウイルスの感染方法、肝炎組織体の製造方法、肝炎ウイルスの増殖方法、肝炎ワクチンの製造方法、スクリーニング方法、及びキット

発明者：アンソンホ，中島謙治，伊藤昌彦，玉井美保，田川陽一，鈴木哲朗

権利者：国立大学法人東京工業大学，国立大学法人浜松医科大学

種類：特許

番号：特許 6418761

取得年：平成 30 年

国内外の別：国内

〔その他〕

なし