

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06606

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルスの肝細胞侵入および増殖機構の構造生物学的解析

研究課題名(英文) Structural analysis of hepatocyte specific entry and replication mechanism of hepatitis B virus

研究代表者

横川 真梨子 (Yokogawa, Mariko)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・講師

研究者番号：60648020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)がどのようにして肝細胞に特異的に侵入するのか、およびHBVが宿主細胞内においてどのように増殖するのかを立体構造の観点から解明し、HBV治療薬創製の構造基盤を得ることを目指した。肝細胞に特異的に発現しているHBV受容体であるNTCPを無細胞合成系にて調製することに成功し、HBVの外殻タンパク質のpreS1領域との相互作用を検出した。HBVの増殖における外殻膜形成にはキャプシドと外殻タンパク質のpreS領域の相互作用が重要であるが、キャプシドは主にpreS2領域と直接相互作用することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、preS1結合活性をもつNTCPの調製に成功した。これまでにHBVのpreS1領域とNTCPの相互作用がHBVの肝細胞侵入に必須であることが報告されているが、NTCPの立体構造は全く分かっていない。今後、NTCPを大量に調製しpreS1との相互作用を解析することで、NTCPとpreS1の複合体構造の解明やNTCPとの結合に重要なpreS1領域上の残基の同定が期待できる。また、キャプシドとpreS領域の相互作用には、主にpreS2領域が関与していることが分かった。この相互作用は、HBV阻害剤の新たな作用点となりうる。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study was to obtain structural basis for hepatocyte specific entry and replication mechanism of hepatitis B virus (HBV), for the treatment of HBV infection. NTCP, an HBV receptor specifically expressed in hepatocyte, was prepared using cell-free protein synthesis system and the preS1-binding activity was successfully confirmed. We also exhibited that preS2 region of HBV large surface protein is important for binding to capsid, which might be important for enveloping of HBV during replication.

研究分野：構造生物学

キーワード：B型肝炎ウイルス タンパク質 タンパク質相互作用 NMR 無細胞合成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全世界には約 2.4 億人の慢性 B 型肝炎患者が存在する。B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染による慢性 B 型肝炎は、肝癌や肝硬変のリスクを高めるため、B 型肝炎の克服は重要な課題である。現在用いられている抗 HBV 薬は核酸アナログとインターフェロンのみであるが、これらの薬ではウイルスを完全に排除することは困難であるため、既存薬とは異なる作用機序をもつ画期的治療薬の創製が望まれている。そのためには、HBV の生活環の原子分解能での理解と、その分子機構を標的とした創薬が有用である。

HBV は、外殻膜の表面抗原タンパク質 L (LHBs) の preS1 領域が、肝細胞特異的に発現している胆汁酸輸送体である NTCP と結合することで、肝細胞に侵入する。肝細胞内では、HBV を構成する DNA やタンパク質が複製され、LHBs はキャプシドを形成したコアタンパク質 (HBc) と結合して外殻膜を形成し、肝細胞外へ放出される。しかし、HBV の侵入・増殖に必須である preS1 - NTCP あるいは LHBs - HBc の相互作用様式は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、HBV の肝細胞への侵入に重要な LHBs の preS1 領域と NTCP の相互作用、および外殻膜形成に重要な LHBs と HBc の相互作用を原子分解能で明らかにすることを目的とした。明らかにした複合体構造や相互作用様式に基づき、これらの相互作用を阻害することによる新規抗 HBV 薬を創製することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) preS1 - NTCP 相互作用

##### NTCP の調製

大腸菌発現系を用いた NTCP の発現・精製、大腸菌抽出液またはコムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系における NTCP の合成・精製または NTCP リポソームの調製を試みた。

##### preS1 と NTCP の相互作用解析

界面活性剤である n-dodecyl-beta-D-maltoside (DDM) に可溶化して調製した NTCP は、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法により preS1 との相互作用を調べた。リポソームとして調製した NTCP は、共沈降実験により preS1 との相互作用を調べた。

#### (2) LHBs - HBc 相互作用

HBc が会合したキャプシドを調製し、負染色電子顕微鏡観測によりキャプシドの形成を確認した。LHBs のうち、preS、preS1、preS2 の各領域とキャプシドとの相互作用を、等温滴定型カロリメトリー (ITC) と溶液 NMR 法を用いて解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) preS1 - NTCP 相互作用

大腸菌発現系にて発現させ、DDM により可溶化精製した NTCP は分解しやすく、高純度で精製することができなかった。そこで、プロテアーゼが混入する可能性が低い無細胞合成系を試すことにし、大腸菌抽出液を用いた無細胞合成系による合成を行った結果、沈殿画分への NTCP の発現に成功した。また、無細胞タンパク質合成の反応液に脂質と界面活性剤を添加し、透析しながらタンパク質合成を行うことで、NTCP をプロテオリポソームとして合成することにも成功した。沈殿またはプロテオリポソームとして得た NTCP を DDM で可溶化し、ヒスチジンタグを用いたアフニティ精製を行うことにより、高純度の NTCP を調製することに成功した。しかし、DDM で可溶化した NTCP と preS1 の結合の SPR 解析では、両者の結合を検出することができなかった。そこで、プロテオリポソーム中の NTCP をそのまま preS1 との相互作用解析に用いることにした。プロテオリポソームとして合成した NTCP は、凝集体として沈殿画分に含まれたため、凍結融解とソニケーションを行うことで、遠心上清に NTCP リポソームを得た。リポソームと preS1 を混合して超遠心を行い、沈殿と上清に含まれるタンパク質を SDS-PAGE により検出する共沈降実験を行った。その結果、NTCP を含まないリポソームと混合しても preS1 は沈殿しなかったが、NTCP を含むリポソームと混合すると NTCP と preS1 の両者が沈殿画分に存在したことから、preS1 がリポソーム中の NTCP と結合して沈殿に移行したことが分かった。よって、調製した NTCP リポソームが preS1 結合活性を有することが分かった。現在、ITC や NMR による定量的解析や原子レベルでの解析に向けて、NTCP リポソームの収量増大および濃縮に取り組んでいる。収量増大の一環として、コムギ胚芽抽出液を用いた無細胞合成系における NTCP リポソームの調製にも取り組み、プレリミナリーな結果ではあるが、高濃度の NTCP リポソームを調製できることが示唆された。

## (2) LHBs - HBc 相互作用

先行報告に従い HBc を重合させることによりキャプシドを調製し、負染色電子顕微鏡観測を行うことにより、キャプシドの調製に成功したことを確認した。LHBs の部分ペプチドである preS (残基番号 2-163)、preS1 (残基番号 2 - 108) または preS2 (残基番号 109 - 163) に対してキャプシドを滴定する ITC 実験による相互作用解析を試みたところ、キャプシドの滴定に伴う熱量変化が観測された。しかし、観測された熱量変化は単純な 1 対 1 の結合として解析できるものではなく、ITC 実験のみから何が起きているのかを解釈することが困難であった。そこで、preS、preS1、または preS2 を観測対象とする溶液 NMR 実験を行い、キャプシドの添加に伴う NMR シグナルの変化を観測した。その結果、preS はキャプシドの添加により全てが沈殿したが、沈殿に preS とキャプシドが含まれたことから、両者が結合して沈殿したことが分かった。PreS1、preS2 はともに、キャプシドの添加に伴いシグナル強度が全体的に減少した。この全体的なシグナル強度減少は、巨大分子であるキャプシドとの結合により分子量が増大したことを示す。PreS1 よりも preS2 の方が強度減少の割合が大きかったことから、キャプシドは preS 領域のうち、preS1 よりも preS2 とより強く結合することが示唆された。キャプシド添加時の preS1 または preS2 の各残基のシグナル強度減少度を比較すると、残基ごとに違いがあった。このことは、各ペプチドが全領域でキャプシドと結合したのではなく、強度減少が小さい領域の運動性が保たれた状態で複合体を形成したことを示唆している。LHBs 上のキャプシド結合残基の同定に向けて、preS1、preS2 ペプチドをさらに分割したペプチドを調製した。今後、これらのペプチドを用いてキャプシドとの相互作用解析を行うことで、LHBs とキャプシドの相互作用様式を明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsumura K., Shimomura T., Kubo Y., Oka T., Kobayashi N., Imai S., Yanase N., Akimoto M., Fukuda M., Yokogawa M., Ikeda K., Kurita J.I., Nishimura Y., Shimada I., Osawa M.	4. 巻 22
2. 論文標題 Mechanism of hERG inhibition by gating-modifier toxin, APETx1, deduced by functional characterization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Molecular and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12860-020-00337-3	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 -

1. 著者名 Kano Hanaho, Toyama Yuki, Imai Shunsuke, Iwahashi Yuta, Mase Yoko, Yokogawa Mariko, Osawa Masanori, Shimada Ichio	4. 巻 10
2. 論文標題 Structural mechanism underlying G protein family-specific regulation of G protein-gated inwardly rectifying potassium channel	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-10038-x	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 -

1. 著者名 Yokogawa M., Fukuda M., Osawa M.	4. 巻 67
2. 論文標題 Nanodiscs for Structural Biology in a Membranous Environment.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem Pharm Bull (Tokyo).	6. 最初と最後の頁 321-326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c18-00941.	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 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 原田彩佳, 石川貴大, 横川真梨子, 前田知輝, 日向寺孝禎, 藤田浩平, 野崎智裕, 嶋田一夫, 大澤匡範
2. 発表標題 分子内ジスルフィド結合による電位依存性K <sup>+</sup> チャネルの膜電位依存的構造変化機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石場 智彬, 横川 真梨子, 横田 旭美, 室井 大輝, 大澤 匡範
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスの肝細胞特異的な侵入機構の解明
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 PABP-interacting Protein 2による翻訳抑制機構の解明
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松村 一輝, 下村 拓史, 久保 義弘, 岡 貴之, 小林 直宏, 今井 駿輔, 築瀬 尚美, 秋元 まどか, 福田 昌弘, 横川 真梨子, 池田 和由, 栗田 順一, 西村 善文, 嶋田一夫, 大澤匡範
2. 発表標題 Gating-modifier toxin APETx1による電位依存性カリウムイオンチャンネルhERG阻害機構の解析
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoaki Ishiba, Mariko Yokogawa, Terumi Yokota, Taiki Muroi, Masanori Osawa
2. 発表標題 Structural basis for the hepatocyte-specific entry of hepatitis B virus
3. 学会等名 第20回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeru Sagae, Mariko Yokogawa, Ryoichi Sawazaki, Nao Hosoda, Shin-ichi Hoshino, Masanori Osawa
2. 発表標題 Structural Mechanism of Translational Repression by PABP-interacting Protein 2
3. 学会等名 第20回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松村 一輝、福田昌弘、築瀬 尚美、秋元 まどか、黒川 洵子、横川真梨子、大澤 匡範
2. 発表標題 Elucidation of the inhibitory mechanism of a sea anemone toxin, APETx1, targeting a human heart voltage-gated potassium channel, hERG1.
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上玲、吉敷純、横川真梨子、松葉広昭、木村友美、川鍋陽、岡村康司、嶋田一夫、大澤匡範
2. 発表標題 電位依存性H <sup>+</sup> チャンネルHv1のアラキドン酸による活性化促進機構の解明
3. 学会等名 第63回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日向寺孝禎、横川真梨子、藤田浩平、野崎智裕、嶋田一夫、大澤匡範
2. 発表標題 電位依存性 K <sup>+</sup> チャンネルの膜電位依存的構造変化機構の解明
3. 学会等名 第63回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高嶋大翔、城えりか、横川真梨子、沢崎綾一、寒河江彪流、尾上耕一、星野真一、大澤匡範
2. 発表標題 BTG2によるポリ A 分解促進機構の構造生物学的解明
3. 学会等名 第63回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河津光作、中塚将一、横川真梨子、中村史佐、木村友美、齋藤潤、佐谷秀行、大澤匡範
2. 発表標題 リン酸化による転写因子FOXO3a の機能抑制機構の解明
3. 学会等名 第63回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松村 一輝, 福田 昌弘, 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
2. 発表標題 Gating modifier toxin, APETx1による電位依存性カリウムイオンチャネルhERG1の阻害機構の構造生物学的解明
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加納 花穂, 外山 侑樹, 今井 駿輔, 岩橋 優太, 間瀬 瑤子, 横川 真梨子, 大澤 匡範, 嶋田 一夫
2. 発表標題 Gタンパク質のファミリー選択的なK <sup>+</sup> チャネル活性制御機構の構造生物学的解明
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解明
3. 学会等名 第57回NMR討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 外山 侑樹, 加納 花穂, 間瀬 瑠子, 横川 真梨子, 大澤 匡範, 嶋田 一夫
2. 発表標題 Gタンパク質共役型内向き整流性カリウムチャネルのエタノール依存的な活性化機構の解明
3. 学会等名 第57回NMR討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Toyama, Hanaho Kano, Yoko Mase, Mariko Yokogawa, Masanori Osawa, Ichio Shimada
2. 発表標題 Structural dynamics of potassium ion channels revealed by side-chain methyl $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ multiple quantum relaxation analyses
3. 学会等名 59th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中久木 友哉, 横川 真梨子, 泉谷 俊稀, 大澤 匡範
2. 発表標題 Hanatoxin1による電位依存性プロトンチャネルHv1阻害機構の解明
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田 浩平, 横川 真梨子, 上和田 遥平, 日向寺 孝禎, 野崎 智裕, 嶋田 一夫, 大澤 匡範
2. 発表標題 電位依存性カリウムイオンチャネルの膜電位依存的構造変化機構の解明
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

〔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	大澤 匡範  (Osawa Masanori)  (60361606)	慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授    (32612)	

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
---------	---------