

平成 30 年 8 月 30 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460565

研究課題名(和文)キナーゼ阻害剤等低分子化合物を用いたB型肝炎ウイルス感染複製機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of regulation mechanisms of hepatitis B virus life cycle by kinases and post-translational modifications

研究代表者

渡士 幸一 (Watashi, Koichi)

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：40378948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)生活環の分子メカニズム、特にこれに関与する宿主細胞性因子に関して十分な理解がされていない。本研究では申請者らが樹立した高効率HBV複製系、HBV感染高許容性細胞を用いてHBV感染複製に関与する宿主因子を同定し、かつ制御メカニズムを解析した。我々はnocodazoleがHBV複製を阻害することから、細胞内微小管がHBV複製の特にcoreタンパク質の多量体化に機能していること、またチューブリンの翻訳後修飾がこれを制御することを明らかにした。またHBV進入を制御するキナーゼを同定した。これらの知見はHBV感染複製の分子機構を理解する上で重要な情報である。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanisms underlying hepatitis B virus (HBV) life cycle has not been fully clarified. In this study, we identified host factors regulating HBV life cycle and analyzed its regulation mechanism by using cell models efficiently supporting HBV infection and replication. Through the identification of nocodazole that inhibited HBV replication, we revealed that cellular microtubules were important for the multimerization of core protein and post-translational modification of tubulin regulated HBV replication. We also identified cellular kinases that regulated HBV entry process. These findings provide information important for understanding the molecular mechanisms of virus-host interaction.

研究分野：ウイルス学

キーワード：肝炎ウイルス 翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルスに比べてB型肝炎ウイルス(HBV)の培養細胞系は簡便さおよび効率が不十分であることから、宿主細胞への侵入、複製、放出、再感染の持続的生活環の再現によるウイルス感染の広がりが高率に見られる実験系が不足しており、HBV生活環の分子メカニズム、特にこれに關与する宿主細胞性因子に關して十分な理解がされていない。

2. 研究の目的

本研究では申請者らの研究グループが樹立した高効率HBV複製系、HBV感染高許容性細胞をそれぞれ用いてHBV感染複製に關与する宿主因子を同定し、かつ制御メカニズムを解明する。特にHBV侵入過程の解析にはHBV感染許容性細胞株を用い、HBV複製機構は高効率HBV複製細胞株を用いて分子生物学的解析をおこなう。またこれらの解析を通して、創薬の標的となり得るウイルス生活環制御機構の同定を目指す。これによりHBV感染複製の分子基盤だけでなく、これを利用した抗HBV剤開発にも有用な知見を得る。

3. 研究の方法

(1) HBV複製を阻害する化合物の同定。

申請者らが樹立した高効率HBV複製系(Hep38.7-Tet細胞)を用いた化合物スクリーニングにより、ウイルス複製を阻害する化合物として微小管脱重合剤nocodazoleを得た。これを解析のプロープとして位置付け、標的宿主機構の同定とその機序の解析を行った。

(2) Nocodazole 標的因子の解析。

Nocodazoleの既知標的である微小管環境がHBV複製を制御するか否かを評価するために、他の微小管脱重合剤のHBV複製への効果を評価した。これら阻害剤処理細胞では有意にHBV複製が低下した。

(3) 微小管によるHBV複製制御機構の解析。

微小管環境により制御されるHBV複製機構を明らかにするために、nocodazole処理細胞での各HBV複製過程の活性：HBVコアプロモータの活性(転写過程)、コアタンパク質量(タンパク質翻訳過程)、多量体したコアタンパク質(キャプシド形成過程)、キャプシド内のHBV RNA量(ヌクレオキャプシド形成過程)とHBV DNA量(逆転写過程)を評価した。微小管脱重合環境ではコアタンパク質量を減少させることなくキャプシド量が大きく低下した。

(4) 微小管依存的なキャプシド形成機序の解析

微小管構成宿主因子であるチューブリンとHBVキャプシドの原料であるコアタンパク質の結合および局在をnocodazole処理細胞にて評価した。上記細胞ではチューブリンとコアタンパク質の相互作用が減少した。

(5) チューブリン翻訳後修飾によるキャプシド形成への影響

チューブリン翻訳後修飾に影響する化合物を処理した細胞でのキャプシド形成量を評価した。アセチル化チューブリン量の増加に伴いキャプシド量が増加した。

(6) HBV感染機構を制御する宿主キナーゼの同定。

上記1-5とは別に、申請者らが樹立したHBV感染高許容性細胞(HepG2-hNTCP-C4細胞)を用いた化合物スクリーニングを行い、HBV感染を制御する宿主キナーゼを見出した。

(7) 宿主キナーゼのHBV感染制御機構の解析。

(6)で得た宿主キナーゼを標的とする阻害剤処理条件下で、細胞表面へのHBV吸着量および細胞内へのHBV侵入量を定量し、キナーゼにより制御されるHBV感染過程を明らかにした。

4. 研究成果

本研究により微小管がHBV複製を制御する宿主環境であることを明らかにした。Nocodazoleおよび他の微小管脱重合剤処理により多量体化したコアタンパク質量が低下したことより、微小管は効率的なキャプシド形成を補助する役割を果たしていると考えられる。加えて、微小管が脱重合した細胞環境ではチューブリンとHBVコアタンパク質の相互作用が減少した。これら結果より、チューブリンとコアタンパク質相互作用の度合いによりキャプシド形成効率が規定される可能性が考えられる。

また、チューブリンのアセチル化を促進することで、HBVキャプシド形成効率が増加し、結果としてHBV複製効率も有意に増加することを明らかにした。これら結果は、宿主細胞性因子チューブリンの翻訳後修飾がHBV複製に重要であることを示す。

申請者はさらに、HBV感染を制御する宿主キナーゼを同定した。このキナーゼはHBV感染過程のうち、細胞内侵入を制御することを明らかにした。この知見は、これまでほとんど明らかとなっていないHBV細胞内侵入過程の分子機構を解明するのに有用である。

さらに本研究では、上記で着目したHBVキャプシド形成および細胞内侵入過程を阻害する低分子化合物をそれぞれ得ている。これらは、既存のHBV治療薬とは異なる作用動態を有するため、新規抗HBV剤開発のリード化合物としても期待される。

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 18 件)

- 1) Kaneko M, Futamura Y, Tsukuda S, Kondoh Y, Sekine T, Hirano H, Fukano K, Ohashi H, Saso W, Morishita R, Matsunaga S, Kawai F, Ryo A, Park SY, Suzuki R, Aizaki H, Ohtani N, Sureau C, Wakita T, Osada H, Watashi K. Chemical array system, a platform to identify novel hepatitis B virus entry inhibitors targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Sci Rep* 8(1): 2769 (2018)
- 2) Iwamoto M, Cai D, Sugiyama M, Suzuki R, Aizaki H, Ryo A, Ohtani N, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Guo H, Watashi K. Functional association of cellular microtubules with viral capsid assembly supports efficient hepatitis B virus replication. *Sci Rep* 7: 10620 (2017)
- 3) Tsukuda S, Watashi K, Hojima T, Isogawa M, Iwamoto M, Omagari K, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Saito A, Tanaka Y, Mizokami M, Sureau C, Wakita T. A new class of hepatitis B and D virus entry inhibitors, proanthocyanidin and its analogs, that directly act on the viral large surface proteins. *Hepatology* 65: 1104-1116 (2017)
- 4) Kinoshita W, Ogura N, Watashi K, Wakita T. Host factor PRPF31 is involved in cccDNA production in HBV-replicating cells. *Biochem Biophys Res Commun* 482: 638-644 (2017)
- 5) Sakurai F, Mitani S, Yamamoto T, Takayama K, Tachibana M, Watashi K, Wakita T, Iijima S, Tanaka Y, Mizuguchi H. Human induced-pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells as an in vitro model of human hepatitis B virus infection. *Sci Rep* 7: 45698 (2017)
- 6) Shimura S, Watashi K, Fukano K, Peel M, Sluder A, Kawai F, Iwamoto M, Tsukuda S, Takeuchi JS, Miyake T, Sugiyama M, Ogasawara Y, Park SY, Tanaka Y, Kusuhara H, Mizokami M, Sureau C, Wakita T. Cyclosporin derivatives inhibit hepatitis B virus entry without interfering the NTCP transporter. *J Hepatol* 66: 685-692 (2017)
- 7) Iwamoto M, Watashi K. Closing the door on hepatitis B and D virus entry: what are our therapeutic options? *Future Virology* 11: 715-718 (2016)
- 8) Leong CR, Funami K, Oshiumi H, Mengao D, Takaki H, Matsumoto M, Ali HH, Watashi K, Chayama K, Seya T. Interferon-stimulated gene of 20KDa protein (ISG20) degrades RNA of hepatitis B virus to impede the replication of HBV in vitro and in vivo. *Oncotarget* 7: 68179-681193 (2016)
- 9) Aly HH, Suzuki J, Watashi K, Chayama K, Hoshino S, Hijikata M, Kato T, Wakita T. RNA exosome complex regulates stability of Hepatitis B Virus's X-mRNA transcript in a Non-Stop mediated (NSD) RNA quality control mechanism. *J Biol Chem* 291: 15958-15974 (2016)
- 10) Okamura H, Nio Y, Akahori Y, Kim S, Watashi K, Wakita T, Hijikata M. Fatty acid biosynthesis is involved in the production of hepatitis B virus particles. *Biochem Biophys Res Commun* 475: 87-92 (2016)
- 11) Watashi K. HBV slow maturation process leading to infection. *Trends Microbiol* 24: 597-599 (2016)
- 12) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Okada M, Sugiyama M, Kojima S, Tanaka Y, Mizokami M, Li J, Tong S, Wakita T. Dysregulation of retinoic acid receptor diminishes hepatocyte permissiveness to hepatitis B virus infection through modulation of sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) expression. *J Biol Chem* 290: 5673-5684 (2015)
- 13) Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Sakurai Y, Watashi K, Tsutsumi S, Sato Y, Akita H, Wakita T, Rice CM, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y, Takaoka A. The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. *Immunity* 42: 123-132 (2015)
- 14) Watashi K, Wakita T. Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus Entry, Species Specificity, and Tissue Tropism. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5: a021378 (2015)
- 15) Yamashita A, Fujimoto Y, Tamaki M, Setiawan A, Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Watashi K, Wakita T, Toyama M, Baba M, de Voogd NJ, Maekawa S, Enomoto N, Tanaka J, Moriishi K. Identification of Antiviral Agents Targeting Hepatitis B Virus Promoter from Extracts of Indonesian Marine Organisms by a Novel Cell-Based Screening Assay. *Mar Drugs* 13: 6759-6773 (2015)
- 16) Matsunaga H, Kamisuki S, Kaneko M,

- Yamaguchi Y, Takeuchi T, Watashi K, Sugawara F. Isolation and structure of vanitaracin A, a novel anti-hepatitis B virus compound from *Talaromyces* sp. *Bioorg Med Chem Lett* 25: 4325-4328 (2015)
- 17) Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Tanaka T, Yamashita A, Yasumoto J, Chen W, Okamoto T, Maekawa S, Watashi K, Wakita T, Ryo A, Suzuki T, Matsuura Y, Enomoto N, Moriishi K. Hepatitis B virus efficiently infects non-adherent hepatoma cells via human sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Sci Rep* 5: 17047 (2015)
- 18) Kaneko M, Watashi K, Kamisuki S, Matsunaga H, Iwamoto M, Kawai F, Ohashi H, Tsukuda S, Shimura S, Suzuki R, Aizaki H, Sugiyama M, Park SY, Ito T, Ohtani N, Sugawara F, Tanaka Y, Mizokami M, Sureau C, Wakita T. A Novel Tricyclic Polyketide, Vanitaracin A, Specifically Inhibits the Entry of Hepatitis B and D Viruses by Targeting Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide. *J Virol* 89: 11945-11953 (2015)
- [学会発表](計 140 件)
- 1) 渡土 幸一. B型肝炎ウイルス培養系の構築から創薬研究へ. 日本薬学会第 138 年会. 金沢. 2018
- 2) 深野 顕人, 九十田 千子, 鈴木 亮介, 相崎 英樹, 村松 正道, 脇田 隆字, 小笠原 裕樹, 渡土 幸一. SLC10A1/NTCP のトランスポーター制御を標的とした新規 B 型肝炎ウイルス感染阻害戦略. 日本薬学会第 138 年会. 金沢. 2018
- 3) Iwamoto M, Cai D, Sugiyama M, Suzuki R, Aizaki H, Ryo A, Ohtani N, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Guo H, Watashi K. The integrity of cellular microtubule structure is important for an efficient HBV capsid formation. 2017 International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Washington, D.C. (USA). 2017
- 4) Hotta H, Chen M, Aoki-Utsubo C, Deng L, Watashi K, Wakita T. Supporting evidence that HBV virions bud mainly through the ER/ERGIC membranes. 2017 International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Washington, D.C. (USA). 2017
- 5) Aly H, Shiromoto F, Watashi K, Hoshino S, Kato T, Chayama K, Wakita T. HBV-X and the balance between degradation or inflammation. 2017 International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Washington, D.C. (USA). 2017
- 6) Tsukuda S, Watashi K, Kojima S, Wakita T. Identification of a new class of HBV and HDV entry inhibitor, proanthocyanidin. 2017 International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Washington, D.C. (USA). 2017
- 7) Okumura A, Ito K, Watashi K, Takeuchi J, Inoue R, Suzuki S, Sakamoto K, Okutsu S, Umezawa K, Wakita T, Yoneda M. Antiviral effect of bile acid derivatives on hepatitis B virus infection. 2017 International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Washington, D.C. (USA). 2017
- 8) Okamura H, Sasai M, Nio Y, Watashi K, Wakita T, Hijikata M. Modulation of HBV life cycle by sulforaphane. 2017 International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Washington, D.C. (USA). 2017
- 9) Okamura H, Nio Y, Watashi K, Wakita T, Hijikata M. Fatty acids with certain carbon chain length can support hepatitis B virus production. 2017 International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Washington, D.C. (USA). 2017
- 10) Zheng X, Aoyagi H, Hossain G, Zaitso T, Puig-Basagoiti F, Kao Y, Watashi K, Suzuki R, Takahashi T, Sunagawa T, Oishi K, Wakita T, Aizaki H. An Epidemiology Study of Acute Hepatitis B in Japan, April 1999 ~ December 2015. 2017 International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Washington, D.C. (USA). 2017
- 11) Aly H, Shiromoto F, Kato T, Watashi K, Chayama K, Wakita T. Targeting HBV-X by regulating Non-Stop mediated RNA decay. 5th JAPAN-TAIWAN-KOREA HBV Research Symposium 2017. Tokyo (Japan). 2017
- 12) Fukano K, Shimura S, Peel M, Sluder A, Kawai F, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Park SY, Wakita T, Ogasawara Y, Watashi K. Identification of HBV entry inhibitors without interfering with the NTCP transporter activity. 5th JAPAN-TAIWAN-KOREA HBV Research Symposium 2017. Tokyo (Japan). 2017
- 13) Yasumoto J, Kasai H, Yoshimura K, Otoguro T, Watashi K, Wakita T, Yamashita A, Tanaka T, Takeda S, Moriishi K. Involvement of cell-death inducing DFF45-like effectors in HBV replication. 5th JAPAN-TAIWAN-KOREA HBV Research Symposium 2017. Tokyo (Japan). 2017

- 14) Iwamoto M, Sugiyama M, Suzuki R, Aizaki H, Tanaka Y, Mizokami M, Ohtani N, Wakita T, Watashi K. Hepatitis B virus capsid formation is regulated by microtubules and their posttranslational modification. 5th JAPAN-TAIWAN-KOREA HBV Research Symposium 2017. Tokyo (Japan). 2017
- 15) Zheng X, Aoyagi H, Hossain GE, Zaitseu T, Puig-Basagoiti F, Kao YT, Watashi K, Suzuki R, Takahashi T, Sunagawa T, Oishi K, Wakita T, Aizaki H. Acute Hepatitis B in Japan, April 1999 ~ December 2015. The 26th of Conference of Asian Pacific Association for the Study of the Liver, ANNUAL MEETING 2017. Shanghai (China). 2017
- 16) Aly HH, Shiromoto F, Watashi K, Kato T, Chayama K, Wakita T. HBV exploit Ski2/RNA complex to degrade cytokines and suppress inflammation. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 大阪. 2017
- 17) Kasai H, Yasumoto J, Yamashita A, Tanaka T, Watashi K, Wakita T, Otoguro T, Moriishi K. The bidirectional interplay of hepatitis B virus and cell-death inducing DFF45-like effectors. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 大阪. 2017
- 18) Fukano K, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T, Ogasawara Y, Watashi K. Identification of a hepatitis B virus internalization inhibitor with a novel mode of action. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 大阪. 2017
- 19) Iwamoto M, Cai D, Sugiyama M, Suzuki R, Aizaki H, Ryo A, Ohtani N, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Watashi K. Interaction of hepatitis B virus core protein with microtubules is important for the efficient capsid formation. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 大阪. 2017
- 20) Rahayu R, Ohsaki E, Honda T, Okamoto T, Watashi K, Ueda K. Analysis of HBV life cycle in the HepG2 expressing human NTCP cell line. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 大阪. 2017
- 21) Okamura H, Nio Y, Watashi K, Wakita T, Hijikata M. Fatty acids synthesized from cellular fatty acid synthesis pathway play roles in hepatitis B virus production. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 大阪. 2017
- 22) 渡土幸一. 生理活性化合物を利用した肝炎ウイルス生活環の解析. 国立成育医療研究センターセミナー. 東京. 2017
- 23) 渡土幸一. B型肝炎ウイルスの培養系と創薬研究. 第19回 仙台 Liver Meeting. 宮城. 2017
- 24) 渡土幸一. B型肝炎ウイルス基礎研究・創薬研究の最近の知見. 衛生微生物技術協議会第38回研究会. 東京. 2017
- 25) 渡土幸一. トランスポーターと肝炎ウイルス. 日本薬物動態学会第32回年会東京. 東京. 2017
- 26) 九十田千子, 渡土幸一, 小嶋聡一, 脇田隆字. NTCP を利用した HBV 創薬研究および NTCP を介した HBV 侵入機構の解析. 2017 年度 生命科学系合同年次大会. 神戸. 2017
- 27) 外山政明, 濱崎隆之, 岡本実佳, 渡土幸一, 脇田隆字, Ashoke Sharon, 馬場昌範. 抗 HBV 効果を有する Neplanocin A 誘導体の作用機序解析. 第27回抗ウイルス療法学会学術集会・総会. 熊本. 2017
- 28) 渡土幸一, 九十田千子, 脇田隆字. B型肝炎ウイルス培養系を用いた創薬研究. 第53回日本肝臓学会総会. 広島. 2017
- 29) 伊藤清顕, 渡土幸一, 米田政志. 胆汁酸代謝調節機構を標的とした B型肝炎ウイルス制御の試み. 第53回日本肝臓学会総会. 広島. 2017
- 30) Iwamoto M, Kakizoe Y, Iwami S, Watashi K. 培養細胞を用いた B型肝炎ウイルス cccDNA の動態解析. 第14回ウイルス学キャンプ in 湯河原. 静岡. 2017
- 他
- 〔図書〕(計 6 件)
- 1) 九十田千子, 渡土幸一: 抗 B型肝炎ウイルス薬の現状と新規薬剤開発のアプローチ 化学療法の領域, 33(1): 73-78, 2017
- 2) 渡土幸一, 相崎英樹: B型肝炎ウイルス研究のトピックス 小児科, 57(9): 1107-1111, 2016
- 3) 渡土幸一, 脇田隆字: B型肝炎ウイルス研究の進歩 Pharma Medica, 34(2): 15-18, 2016
- 4) 渡土幸一, 脇田隆字: B型肝炎ウイルスエントリーについて: メカニズムとその阻害肝胆膵, 71(6): 1053-1058, 2015
- 5) 渡土幸一: HBV の細胞内侵入機構とこれを標的とした創薬 日本臨床, 73(増刊号 9): 372-376, 2015
- 6) 渡土幸一, 脇田隆字: 新規 B型肝炎抗ウイルス薬開発の現状 カレントセラピー, 33(9): 59-63, 2015
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕
- ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡士 幸一 (Koichi Watashi)
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：40378948

(4) 研究協力者

九十田 千子 (Senko Tsukuda)
国立感染症研究所・ウイルス第二部・
協力研究員

岩本 将士 (Masashi Iwamoto)
国立感染症研究所・ウイルス第二部・
研究生

大橋 啓史 (Hirofumi Ohashi)
国立感染症研究所・ウイルス第二部・
研究生