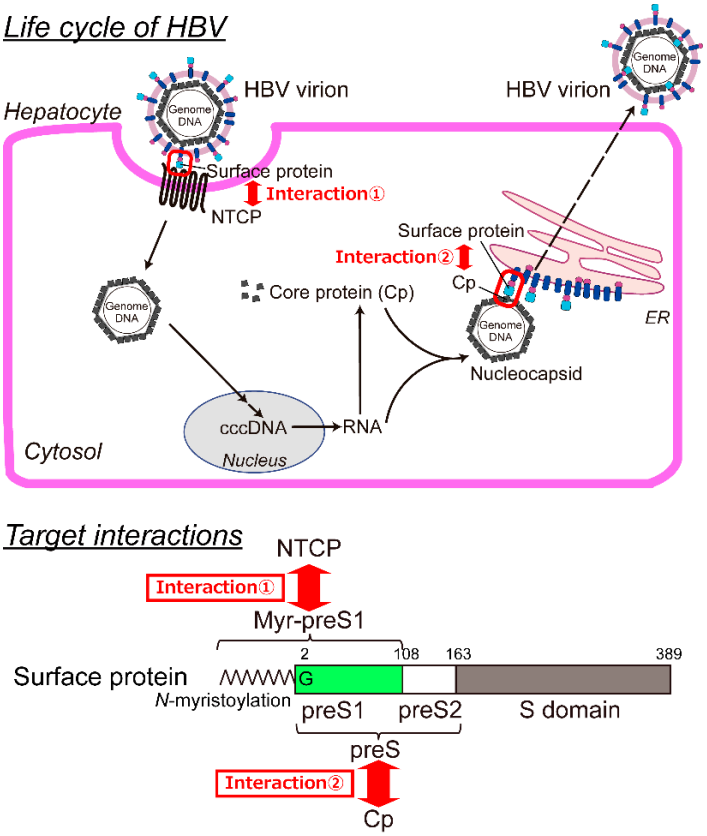
109　B型肝炎ウイルス感染機構の構造基盤	横川　真梨子

【目的】B 型肝炎ウイルス（HBV）は、肝細胞に侵入し、肝炎を引き起こす DNA ウイルスである。全世界には約 3 億 5 千万人の HBV 感染患者が存在するが、現在までに確実な治療法は確立されておらず、新たな作用点を持つ画期的治療薬の創製が望まれている。そのためには、HBV の生活環を明らかにすることが有用である。本研究では、近年明らかとなった HBV の受容体である Na^+・胆汁酸トランスポーター（NTCP）と HBV の外殻タンパク質の結合による肝細胞への侵入機構、および肝細胞内で複製した HBV のヌクレオキャプシドと外殻タンパク質の結合による HBV 粒子の形成機構に着目した。これらのタンパク質ータンパク質間相互作用様式を明らかにすることで、これらの相互作用を阻害することによる革新的抗 HBV 薬の創製を目指した。
【方法】HBV の外殻タンパク質の preS、preS1、preS2 領域、ヌクレオキャプシドを構成する HBV のコアタンパク質（Cp）は大腸菌発現系を用いて調製した。PreS1、preS2 は ^{13}C, ^{15}N 標識体の溶液 NMR 解析より主鎖シグナルの帰属を行った。溶液 NMR 法により、preS1 および preS2 と Cp の相互作用、preS1 への N 末端ミリストイル化の影響を解析した。NTCP は大腸菌発現系を用いたサンプル調製法の確立を試みた。
【結果】溶液 NMR 解析により、外殻タンパク質上の Cp 結合領域を同定した。Myr-preS1 は、ミリストイル基近傍の N 末端領域が膜と結合することが示唆された。NTCP は大腸菌での発現をウェスタンブロットで確認した。

B 型肝炎ウイルスの生活環と本研究において標的とするタンパク質ータンパク質相互作用



109. B 型肝炎ウイルス感染機構の構造基盤

横川　真梨子

慶應義塾大学 薬学部 薬科学科 生命機能物理学講

Key words：B 型肝炎ウイルス，溶液 NMR，タンパク質－タンパク質相互作用

緒　言

B 型肝炎ウイルス（HBV）は、肝細胞に侵入し、肝炎を引き起こす DNA ウイルスである。全世界には約 3 億 5 千万人の HBV 感染患者が存在するが、確実な治療法は確立されておらず、新たな作用点を持つ画期的治療薬の創製が望まれている。そのためには、HBV の生活環を明らかにすることが有用である。近年、肝細胞に特異的に発現している Na^+・胆汁酸トランスポーター（NTCP）が HBV の受容体であることが明らかになった［1］。さらに、NTCP に作用して HBV の結合を阻害する化合物は、現在、HBV 阻害薬として開発が進められている［2］。したがって、NTCP と HBV の相互作用は、HBV 阻害薬創製の標的として有望である。また、HBV 粒子は、ゲノム DNA を内包したヌクレオキャプシドが外殻膜に覆われた構造をもち、外殻膜の形成・増殖には外殻タンパク質とキャプシドの相互作用が重要であることが知られている［3］。よって、外殻タンパク質とキャプシドの相互作用も抗 HBV 薬の標的として有望である。そこで本研究は、HBV の外殻タンパク質と NTCP あるいは HBV の外殻タンパク質とキャプシドの相互作用様式を明らかにすることで、HBV の感染・増殖機構の構造基盤を得ることを目的とした。

HBV の外殻タンパク質、キャプシドを構成するコアタンパク質を大量に調製し、溶液 NMR 法による相互作用解析を行い、外殻タンパク質上のコアタンパク質結合領域を同定した。NTCP は大腸菌での発現をウェスタンブロットで確認することに成功し、現在、精製法の確立を進めている。

方　法

1. 各種タンパク質の調製

HBV の外殻タンパク質のうち、N 末端から残基番号 163 までの preS 領域および preS の N 末端側 107 残基の preS1、C 末端側 55 残基の preS2 領域の 3 種類について、それぞれ大腸菌で発現させ、単一バンドとして精製した。また、N 末端のグリシン残基がミリストイル基で修飾されたミリストイル化 preS1（myr-preS1）は、精製した preS1 に対して、精製した N 末端ミリストイル基転移酵素を作用させる *in vitro* ミリストイル化反応により調製した。

コアタンパク質は、キャプシド形成能をなくした変異体を大腸菌で発現させ、単一バンドとして精製した。

NTCP は大腸菌での発現検討を行い、抗 His タグ抗体を用いたウェスタンブロット法により発現・精製を確認した。

2. 溶液 NMR 法による解析

^{15}N で安定同位体標識を行った preS, preS1, preS2 の ^{1}H-^{15}N HSQC 測定を行い、NMR スペクトルを比較した。^{13}C, ^{15}N で安定同位体標識を行った preS1 と preS2 について、それぞれ三重共鳴測定により主鎖連鎖帰属を行った。Myr-preS1 の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを preS1 と比較し、界面活性剤ミセルとの相互作用領域を調べた。コアタンパク質添加に伴う preS, preS1, preS2 の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルの変化を観測し、preS 中のコアタンパク質の相互作用領域を同定した。

結果および考察

1. 単独状態の preS，preS1，preS2 の ^{1}H-^{15}N HSQC 測定

PreS は N 末端側に preS1、C 末端側に preS2 の配列を有する。PreS の NMR スペクトルは、preS1 および preS2 の NMR スペクトルの両者とよく重なり、いずれも主鎖アミドプロトンのシグナルが ^{1}H 方向に約 7.6 ppm から 8.5 ppm の間に存在する狭い分布を示した（図 1）。よって、preS、preS1、preS2 はいずれも単独状態で特定の立体構造を形成していないことが分かった。^{13}C，^{15}N 標識 preS1 と preS2 の三重共鳴測定を行うことで、主鎖 NMR シグナルの帰属を確立した。

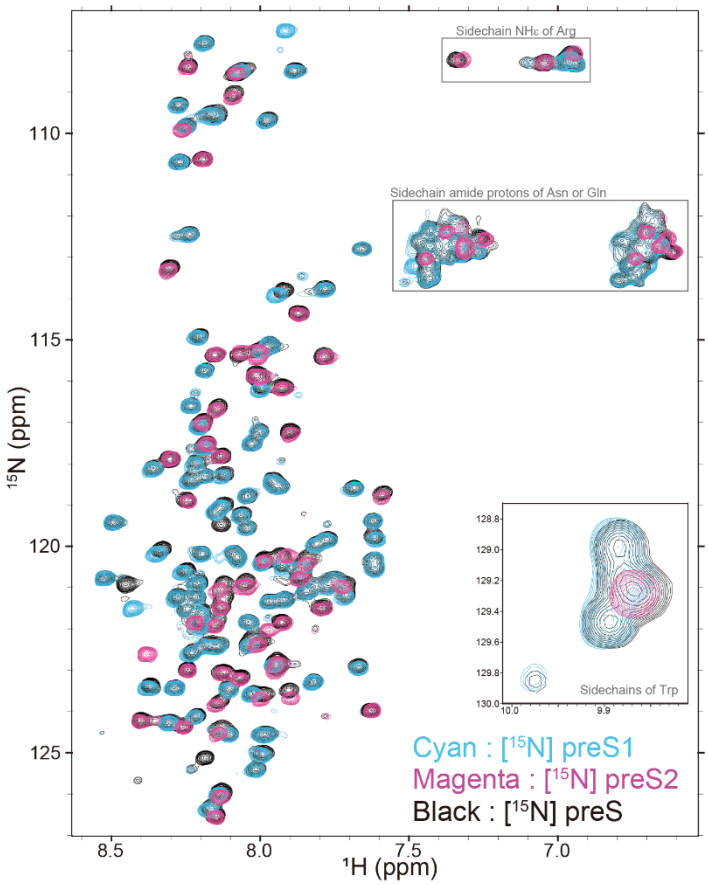


図 1. preS，preS1，preS2 の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトル

PreS の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを黒、preS1 をシアン、preS2 をマゼンタで重ね合わせた。横軸が ^{1}H の化学シフト値、縦軸が ^{15}N の化学シフト値を示し、シグナルはそれぞれ、配列中の各アミノ酸残基のアミドプロトンを示す。

2. preS 領域とコアタンパク質の相互作用

^{15}N 標識 preS1 へのコアタンパク質添加では、^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルに変化がほとんど観測されなかった（図 2a）。一方で、^{15}N 標識 preS2 にコアタンパク質を添加すると、一部のシグナルに広幅化による顕著な強度減少が観測された（図 2b）。このことは、コアタンパク質が preS2 と結合したことを示す。顕著な変化が観測されたシグナルは、残基番号 110～130 の preS2 領域であり、この領域とコアタンパク質の相互作用が HBV の外殻膜形成による増殖に寄与している可能性がある。

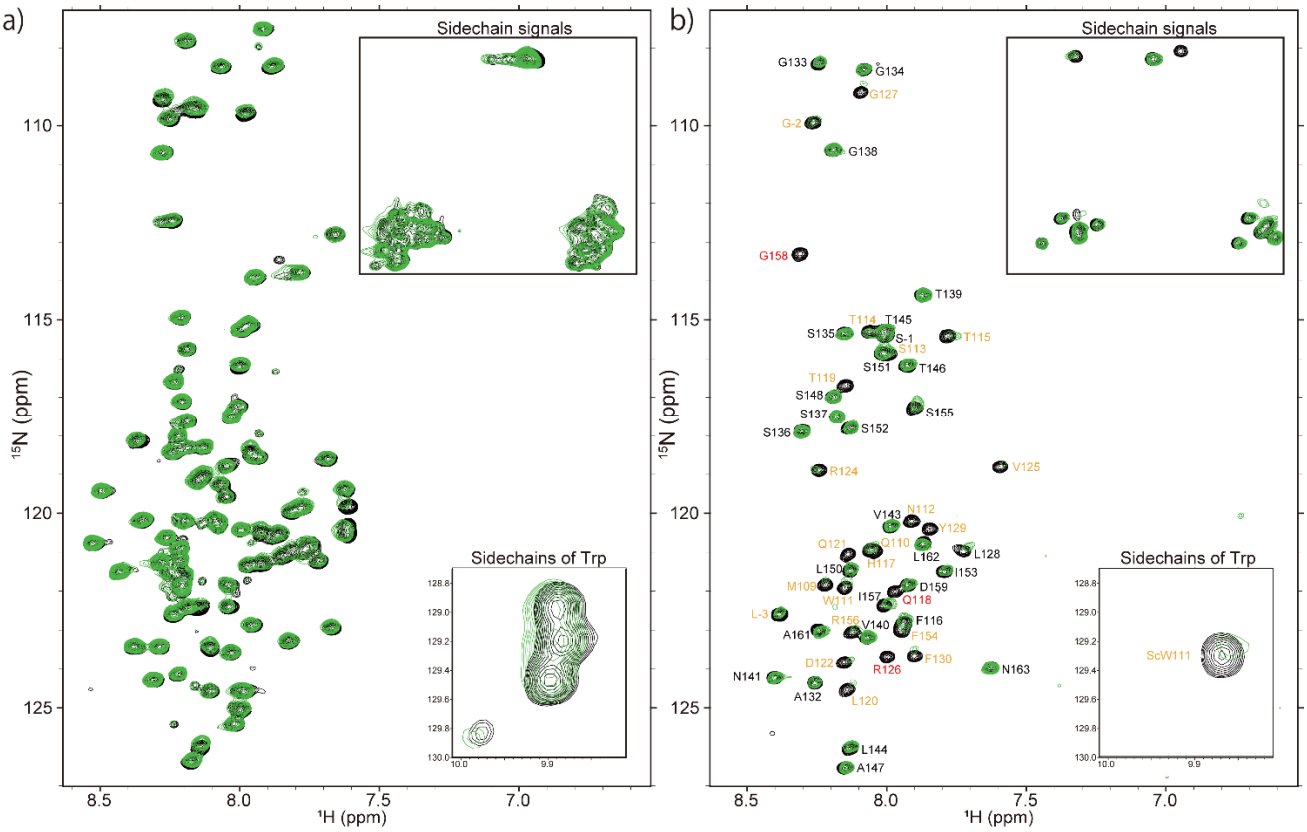


図 2. PreS1 および preS2 とコアタンパク質の相互作用解析

a) ^{15}N 標識 preS1 単独を黒、5 等量のコアタンパク質を添加した条件を緑で重ね合わせた ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトル。

b) ^{15}N 標識 preS2 単独を黒、5 等量のコアタンパク質を添加した条件を緑で重ね合わせた ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトル。コアタンパク質の添加により消えたシグナルを赤、顕著に強度が減少したシグナルを黄色でラベルを付した。

3. myr–preS1 と界面活性剤ミセルの相互作用

PreS1 は水溶性が高いが、myr-preS1 は水溶性が低下しており、界面活性剤である *n*-ドデシル-β-D-マルトシド(DDM)により溶解した。PreS1 は DDM を添加しても ^{1}H-^{15}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が、myr-preS1 の DDM 中における NMR シグナルの多くは、同じ測定条件の 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なかった（図 3）。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(図 4)。

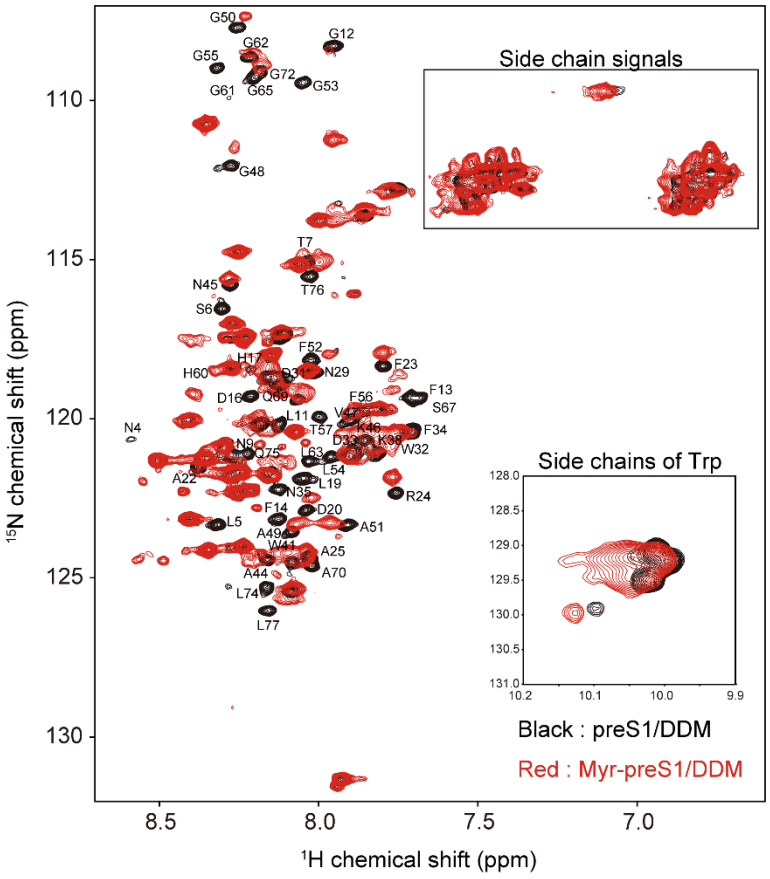


図 3. DDM 存在下における preS1 と myr–preS1 の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトル

^{15}N 標識 preS1 を黒、^{15}N 標識 myr-preS1 を赤で重ね合わせた。Myr-preS1 において、同じ化学シフト値にシグナルが観測されなかった preS1 のシグナルに残基名のラベルを付した。

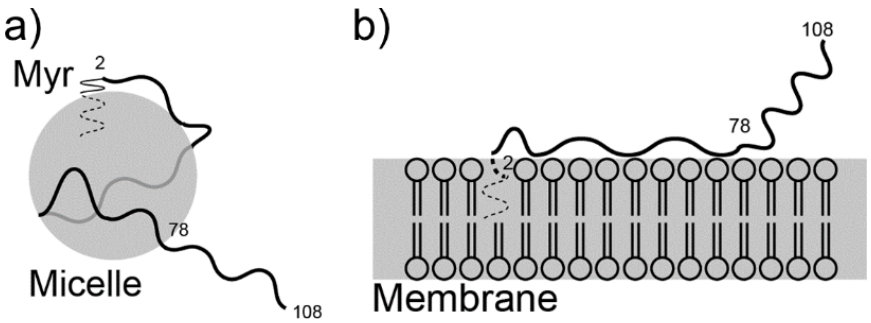


図 4. Myr–preS1 と膜の相互作用

a）Myr-preS1 と DDM ミセルの相互作用モデル、b）Myr-preS1 と脂質膜の相互作用モデル

4. 大腸菌発現系を用いた NTCP の大量調製

NTCP はヒスチジンタグ（His タグ）融合体として発現させ、抗 His タグ抗体を用いたウェスタンブロット（WB）により、目的タンパク質の発現を確認した。界面活性剤である DDM により可溶化した上清の Ni^{2+}アフィニティ精製フラクションの SDS-PAGE を行ったところ、目的タンパク質がレジンに結合し、イミダゾールで溶出したことが WB により分かったが、CBB 染色から夾雑タンパク質を多く含むことも分かった。His タグアフィニティ精製における精

製度を改善するため、Co^{2+}アフィニティカラムに変更したところ、夾雑タンパク質の量は減ったものの、依然として抗 His タグ抗体では検出されない複数のバンドが存在し、NTCP のバンドを CBB 染色で明瞭に観測することはできなかった。現在、精製法を検討するとともに、先行報告において発現実績のある大腸菌由来の無細胞発現系［4］を用いた発現・精製に取り組んでいる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、慶應義塾大学薬学部・生命機能物理学講座の大澤匡範教授である。本稿を終えるにあたり、ご支援を頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1） Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. Elife. 2012 Nov 13;1:e00049. PMID: 23150796 DOI: 10.7554/eLife.00049.

2） Lempp FA, Ni Y, Urban S. Hepatitis delta virus: insights into a peculiar pathogen and novel treatment options. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2016 Oct;13(10):580-9. Epub 2016 Aug 18. PMID: 27534692 DOI: 10.1038/nrgastro.2016.126.

3） Bruss V, Thomssen R. Mapping a region of the large envelope protein required for hepatitis B virion maturation. J Virol. 1994 Mar;68(3):1643-50. PMID: 8107225

4） 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. 2015 Dec;89(23):11945-53. Epub 2015 Sep 16 PMID: 26378168 DOI: 10.1128/JVI.01855-15