

が、NTCP 単独で機能していないことが示唆されており、パートナー分子の同定が急務である。また、NTCP 以外の分子が関与している可能性も十分あり、我々が進めている BNC 固定化ビーズによるプルダウンアッセイ（従来のペプチド型プローブより HBV に近いので期待）や、全自動 1 細胞解析単離装置によるハイスループットスクリーニング（従来の FACS よりも低い陽性比率でも検出可能）も急ぎ行う予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 良元伸男、黒田俊一： バイオナノカプセル（中川晋作監修）DDS の人体・環境・ものづくりへの適用技術 (NTS・東京) 2013 年 118-126 頁
- 2) 良元伸男、黒田俊一： バイオナノカプセルによる生体内ピンポイント薬物・遺伝子送達技術（名古屋大学最先端メディカルエンジニアリング編集委員会）最先端メディカルエンジニアリング（一粒書房・東京） 2014 年 不明
- 3) Yoshimoto N., and Kuroda, S.: Single-cell-based breeding: Rational strategy for the establishment of cell lines from a single cell with the most favorable properties (REVIEW). J. Biosci. Bioeng. 未定 (2014)
- 4) Iijima, M., Yoshimoto, N., Niimi, T., and Kuroda, S.: Nanocapsule-based probe for evaluating the orientation of antibodies immobilized on a solid phase. Analyst Vol. 138 pp.3470-3477 (2013)
- 5) Iijima, M., Yamamoto, M., Yoshimoto, N., Niimi, T., and Kuroda, S.: Bio-nanocapsules for signal enhancement of alkaline phosphatase-linked immunosorbent assays. Biosci. Biotech. Biochem. Vol. 77 pp.843-846 (2013)

- 6) 曾宮正晴、良元伸男、黒田俊一： バイオナノカプセル-リポソーム複合体の生体内ピンポイント薬剤送達への応用 ファインケミカル Vol.42 pp.44-49 (2013)
- 7) 松尾英典、良元伸男、黒田俊一： バイオナノカプセルを用いた生体内ピンポイント DDS 技術の開発 表面 Vol.50 pp.207-218 (2013)
- 8) 飯嶋益巳、黒田俊一： バイオナノカプセルを用いるイムノセンシング分子の整列化技術 バイオサイエンスとバイオインダストリー Vol.71 pp.314-317 (2013)

2. 学会発表  
該当なし

### G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

## HBV エンベロープタンパク質と相互作用する 細胞膜表面分子の網羅的探索

研究分担者 黒木 和之

金沢大学がん進展制御研究所 准教授

研究要旨：HBV 感染に関わるウイルスレセプター等の宿主分子の探索・HBV 創薬研究に適した *in vitro* 感染系に利用可能な培養細胞を探索するため、HBV の感染成立を迅速・簡便に検出できるよう、自立的な増殖能を欠損し、かつマーカー遺伝子を組み込んだ組換え HBV ベクターを新たに作製し改良した。また、これら組換え HBV 産生用に HepG2 細胞および HEK293 由来のパッケージング細胞を樹立した。HBV 全蛋白質の発現を二つのレトロウイルス発現ベクターに分担させることにより HBV ゲノム間の相同組換えによる野生型 HBV の出現を強く抑制するパッケージング系を構築した。iPS 細胞より分化誘導した肝細胞では組換え HBV の感染が認められ *in vitro* 感染系として有用であることが示された。

### A. 研究目的

本研究の目的は HBV 初期感染に関わるウイルスレセプターを含む宿主分子群の同定およびこれら分子と HBV の interaction を阻害する化合物の探索・創薬を通じて HBV の感染・増殖を阻止する方策を得ることにある。この目的のため昨年度に続き、HBV の感染成立を迅速・簡便に検出できるよう、自立的な増殖能を欠損しかつマーカー遺伝子を組み込んだ組換え HBV ベクターを構築し HBV *in vitro* 感染系に利用可能な培養細胞系を探索することとした。

### B. 研究方法

#### 組換え HBV ベクターの構築

HBV は genotype A を用いた。HBV 発現ベクターは CMV IE プロモーターより HBV pregenomic RNA を合成する pCSH4 プラスミドを用いた。組換え HBV ベクターでは、HBV ゲノムサイズが変化することのないよう GeneArt (ライフテクノロジーズ) を使ってマーカー遺伝子（新たに Halo-tag、tdTomato) 等対象 DNA を HBV ベクターの HBV S 遺伝子およびその近傍の部位と塩基数を合わせて置換した。さらに HBV ベクターの改良も行った。感染成立の検出感度を高めるためマーカー遺伝子の発現プロモーターを HBV S 遺伝子プロモーターから CMV IE プロモーターに置き換えること、また、より安全性を高めるため pregenomic RNA 合成

を抑制することが知られている core 遺伝子プロモーター変異を導入すること、および、全 HBV 遺伝子内へ変異 (stop codon) を導入することにより HBV ゲノム間の相同組換えによる野生型 HBV の出現をより強力に抑える対策を講じた。

#### 組換え HBV パッケージング細胞の作製

HBV ベクター同様、細胞内での HBV ゲノム間の相同組換えによる野生型 HBV の出現の可能性をより低く抑えるため、HBV 複製ドメイン及び polyA シグナルを欠いた HBV core、polymerase、X 遺伝子発現用と HBV envelope 遺伝子発現用のコンストラクトをそれぞれレトロウイルスベクターを介して HepG2 細胞や HEK293 細胞に導入し HBV パッケージング用細胞を樹立した。

#### 組換え HBV の産生と培養細胞への感染

組換え HBV ベクタープラスミド DNA を安定に組み込んだパッケージング細胞の培養上清中の HBV を研究に用いた。HBV を各種培養条件のもと、4%PEG8000 存在下で感染実験を行った。感染成立は RT-PCR による HBV mRNA の検出、および HBV ベクターのマーカ―遺伝子の発現により検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、HBV ベクターを用いた実験を行うことから文部科学省の定める省令「研究開発等に係わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止処置等を定める省令」(平成 16 年文部科学省・環境省令第 1 号)・組換え DNA 実験指針・金沢大学研究用微生物安全管理規程等に則り本学安全委員会等の承認を得て、その指示の下で研究は進められる。

### C. 研究結果

#### 組換え HBV ベクターの構築

感染成立の検出感度を高めるためマーカ―遺伝子の発現プロモーターを HBV S 遺伝子プロモーターから CMV IE プロモーターに置き換えた HBV ベクターを作製した。これらベクターでは、sNanoLuc 等マーカ―遺伝子の発現を従来に比べ 100 倍以上高めることができた。また、より安全性を高めるため pregenomic RNA 合成を抑制することが知られている core 遺伝子プロモーターへの変異を導入するとともに、全 HBV 遺伝子へ変異 (stop codon) を導入した HBV ベクターを構築した。これら HBV ベクターは  $10^5 \sim 10^7$ /ml の HBV 粒子を培養液中に放出させており従来のもと同程度で低下することはなかった。この結果、HBV ベクターでは少なくとも全ゲノムの 43.1% (1,388 塩基) を外来 DNA と置換できることがわかった。

#### 組換え HBV パッケージング細胞の作製

昨年度樹立した HepG2 由来のパッケージング細胞 HepG2PH は  $\sim 10^6$ /ml の組換え HBV 粒子を産生することが示された。今回作製した HEK293 由来のパッケージング細胞 29392 は  $10^7$ /ml とより多くの組換え HBV を産生することができる。しかし、抗 HBs 抗体、抗 HBc 抗体を用いた免疫沈降法による解析から多くの未成熟 HBV 粒子の存在が示唆された。

#### HBV in vitro 感染系について

HBV レセプター候補 NTCP 遺伝子の安定発現株を HuH7 細胞および HepG2 細胞より樹立した。これら細胞への HBV 感染効率は低かった (全細胞の 0.1%以下と推定された)。

iPS細胞Dotcomより分化誘導した細胞ではHBV-GLucの感染実験からマーカー遺伝子GLucの発現がみられ感染成立が示唆され、現在詳細な解析を進めている。

#### D. 考察

##### HBV ベクターの改変について

組換えHBVのマーカー遺伝子の発現量を上げることはHBV感染成立の検出感度をさらに高める上で重要である。マーカー遺伝子の発現に利用していたS遺伝子プロモーターをより強力なCMV IEプロモーターと置き換えることによりマーカーの発現を高めることができHBV感染をより容易に高感度に検出できるようになる系を作り上げることができた。また、このような強力なプロモーターのHBVゲノムへの導入が組換えHBV産生に影響をあたえることはないことがわかった。ベクターとしてより安全性を高めるため全HBV遺伝子にstop codon変異を導入した組換えHBVベクターを構築したがこれらの変異導入も組換えHBV産生に影響することは無かった。HBV感染メカニズムやHBV感染に関与する宿主因子の網羅的探索、HBV感染を阻止する化合物の探索に有用なツールになると考えている。

##### 組換えHBVのパッケージング細胞について

HepG2細胞に加えて、遺伝子の導入・培養増殖の容易なHEK293由来のパッケージング細胞29392を樹立した。この細胞は $10^7$ /mlとより多くの組換えHBVを産生することができるが、抗HBs抗体、抗HBc抗体を用いた免疫沈降法による解析から多くの未成熟HBV粒子の存在が示唆された。さら

に効率の良いHBV産生系とするには不足していると思われるHBVエンベロープ蛋白質の供給を増やす必要があると考えている。

##### HBV in vitro 感染系について

HuH7細胞およびHepG2細胞由来のNTCP安定発現細胞はHBVに感染可能となるが、HepaRG細胞と比べると効率は低い。期待したほど感染効率が上がらないことからHBV感染の分子メカニズムは複雑でこれら細胞には足りない複数の宿主因子が関与していることが予想される。現在、組換えHBVベクターを使ってこれら宿主因子の網羅的探索を進める準備を行っている。iPS細胞の分化誘導によって得られる肝細胞は肝臓特異的遺伝子の発現量等その特性が多様であることからHBVに対する感受性についても同様であると考えられる。さらに多種のiPS細胞について肝細胞への分化誘導とHBV感染能獲得について検討することでHBV感染研究により適したin vitro感染系が見いだされると考え進めている。

#### E. 結論

従来よりマーカー遺伝子の発現を100倍高め、HBV感染を高感度に検出するHBVベクターを構築でき、HBV感染メカニズムやHBV感染に関与する宿主因子の網羅的探索、HBV感染を阻止する化合物の探索に有用なツールになると考えている。

HEK293細胞を用いて $10^7$ /mlのHBVを産生する効率の良い新たなHBVパッケージング系を作った。

iPS細胞より分化誘導した肝細胞ではHBVの感染が認められ、in vitro感染の有

用な系となる可能性を示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

黒木和之、久保周子：HBV ベクターの構築  
第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013  
年 11 月 10 日～12 日（神戸、神戸国際会議  
場）

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## HBV感染におけるリン酸化タンパク質の機能解析

研究分担者 岡本 徹  
大阪大学微生物病研究所 助教

研究要旨: HBV の受容体であるヒト NTCP を発現するトランスジェニックマウスの作製を遂行するとともに、酵母ツーハイブリッドスクリーニングで、HBx 蛋白質と相互作用する分子として FBXL5 が同定した。FBXL5 は CUL1/SKP1 と複合体を形成し、HBx 蛋白質を特異的にユビキチン化し、プロテアソームによって分解する分子であることが示唆された。

### A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) は肝癌を発症するウイルスであり、世界でも 2 億人もの感染者がいるとされている。治療薬としては逆転写阻害剤が用いられているが、その著効率は低く、また一生涯服用せねばならず、有効な治療法とは言い難い。様々なウイルスは宿主細胞への感染を成立させるために、近年、HBV の受容体として同定された Na<sup>+</sup> 依存的胆汁酸胆汁酸トランスポーター (NTCP) は、ヒト NTCP は HBV の受容体として機能するが、マウスの NTCP は機能しないことから、HBV が感染できる動物種を NTCP が規定している可能性が示唆された。そこで、ヒトの NTCP を発現するトランスジェニックマウスを作製し、HBV 感染を許容できるマウスができるかを検討する。また、HBV の複製や発癌に関与する HBx 蛋白質の機能解析を行うため、酵母ツーハイブリッド法により HBx 蛋白質と相互作用する宿主蛋白質の同定を行った。

### B. 研究方法

HBV は効率の良く複製できる動物モデルがない。そのため、近年 HBV の受容体として同定されたヒト NTCP を発現するトランスジェニックマウスを作製し、HBV 感染に感受性を持つマウスができるかを検討する。

HBx 蛋白質との相互作用する分子を同定するため、酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行った。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報を厳格に管理、保存する。

### C. 研究結果

HBV の受容体候補であるヒト型 NTCP を発現するマウスを作製するため、肝臓特異的なプロモーターである、アルブミンプロモーターの下流にヒト NTCP の cDNA を挿入し、マウス胚へ導入し、ヒト NTCP 発現マウスを得た。

HBx 蛋白質と相互作用する新規分子として FBXL5 を同定した。FBXL5 は HBx と相互作用し、CUL1/SKP1 と複合体を形成し、HBx をユビキチン化しプロテアソーム依存的に分解することが明らかとなった。

### D. 考察

得られたヒト NTCP 発現トランスジェニック

クマウスが HBV 感染を許容することができるかについて早急に検討する。

HBx 蛋白質の分解メカニズムを明らかにすることで、HBV 複製や病原性をコントロールできると考えられる。

## E. 結論

ヒト NTCP を発現するトランスジェニックマウスを作製した。また、HBx 蛋白質が FBXL5 と相互作用し、ユビキチン化を受けて分解されていることを見いだした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kelly GL, Grabow S, Glaser SP, Fitzsimmons L, Aubrey BJ, Okamoto T, Valente LJ, Robati M, Tai L, Fairlie WD, Lee EF, Lindstrom MS, Wiman KG, Huang DCS, Bouillet P, Rowe M, Rickinson AB, Herold MJ and Strasser A. Targetting of MCL-1 kills MYC-driven mouse and human lymphomas even when they bear mutations in p53, *Genes Dev* 28(1):58-70 (2014)
2. Okamoto T, Coultas L, Metcalf D, van Delft M, Glasser SP, Takiguchi M, Strasser A, Bouillet P, Adams JM, Hunag DCS. Enhanced Mcl1 stability can blunt stress-induced apoptosis, cause male sterility and promote tumorigenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(1): 58-70 (2014)
3. Murphy JM, Czabotar PE, Hildebrand JM, Lucet IS, Zhang JG, Alvarez-Diaz S, Lewis R, Lalaoui N, Metcalf D, Webb AI, Young SN, Varghese LN, Tannahill GM, Hatchell EC, Majewski IJ, Okamoto T, Dobson RC, Hilton DJ, Babon JJ, Nicola NA, Strasser A, Silke J, Alexander WS. The Pseudokinase MLKL Mediates Necroptosis via a Molecular Switch Mechanism. *Immunity*. 39: 443-453 (2013)
4. Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, Umemoto E, Matsuura Y, Yamamoto M, Takeda K. Ifit1 inhibits JEV replication through binding to 5' capped 2' -O unmethylated RNA. *J Virol*. 87(18): 9997-10003 (2013)
5. Moujalled DM, Cook WD, Okamoto T, Murphy J, Lawlor KE, Vince JE, Vaux DL. TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. *Cell Death Dis*. Jan 17;4:e465 (2013)
6. Okamoto T, Zobel K, Fedorova A, Quan C, Yang H, Fairbrother WJ, Huang DC, Smith BJ, Deshayes K, Czabotar PE. Stabilizing the Pro-Apoptotic BimBH3 Helix (BimSAHB) Does Not Necessarily Enhance Affinity or Biological Activity. *ACS Chem Biol*. 8(2): 297-302 (2013)

### 2. 学会発表

1. 福原 崇介、塩川 舞、小野 慎子、山本 聡美、和田 真実、岡本 徹、野田 健司、吉森 保、松浦 善治、HCV 感染により誘導されるオートファジーの性状、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、兵庫、11 月 10 日-12 日、2013
2. 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、山本聡美、和田真実、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治、miR-122 ノックアウト Huh7 細胞における HCV 増殖、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、兵庫、11 月 10 日-12 日、2013
3. 和田真実、福原崇介、山本聡美、塩川舞、小野慎子、岡本 徹、松浦善治、C 型肝炎ウイルスの粒子産生における VLDL 関連タンパク質の役割、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、兵庫、11 月 10 日-12 日、2013
4. 山本聡美、福原崇介、塩川 舞、小野慎子、岡本 徹、松浦善治、B 型肝炎ウイルスの増殖に関与する宿主因子の解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、兵庫、11 月 10 日-12 日、2013
5. 川岸崇裕、金井祐太、岡本 徹、松浦善治、小林剛、哺乳類オルソレオウイルスの腫瘍細胞溶解能の検討と遺伝子操作系の確立、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、兵庫、11 月 10 日-12 日、2013
6. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Masami Wada, Chikako Ono, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity, 20th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses, Australia, Oct 6<sup>th</sup>-10<sup>th</sup>, 2013

7. Toru Okamoto, Yukari Sugiyama, Chikako Ono, Sayaka Aizawa, Pham Duc Ngoc, Takahisa Kohwaki, Eiji Hirooka, Takasuke Fukuhara, Masahiro Yamamoto, Yoshiharu Matsuura, Roles of de-ubiquitinating enzymes on the propagation of HCV, 20th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses, Australia, Oct 6<sup>th</sup>-10<sup>th</sup>, 2013
  8. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Propagation of HCV in the miR-122-knockout Huh7 cells, 20th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses, Australia, Oct 6<sup>th</sup>-10<sup>th</sup>, 2013
  9. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Takashi Motomura, Mai Shiokawa, Chikako Ono, Hiroto Kambara, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity, 32nd American Society for Virology, Annual Meeting, USA, JULY 20<sup>th</sup>-24<sup>th</sup>.
  10. Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Akinori Ninomiya, Takasuke Fukuhara, Toru Okamoto, Takayuki Abe, and Yoshiharu Matsuura, Innate immune response induced by baculovirus suppresses transgene expression, 32nd American Society for Virology, Annual Meeting, USA, JULY 20<sup>th</sup>-24<sup>th</sup>.
- G. 知的所得権の出願・登録状況
1. 特許取得  
該当無し
  2. 実用新案登録  
該当無し
  3. その他

## 細胞表面の糖鎖変化と HBV 感染に関する研究

研究分担者 三善 英知

大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学 教授

研究要旨：糖鎖は細胞表面の多くのタンパク質に結合し、その構造は炎症やがんに伴って変化することが知られている。本研究では、いくつかの糖鎖改変肝がん細胞と HBV 感染細胞 HB611 を用いて、HBV の感染性の変化について検討した。そしていくつかの糖鎖変化の中でフコースによる糖鎖変化 (フコシル化) とシアル酸による糖鎖変化 (シアリル化) に注目し、糖鎖による HBV 感染性変化の分子機構に関して考察した。

### A. 研究目的

HBV(B 型肝炎ウイルス) には肝細胞特異的な受容体の存在が示唆されるが、今まで確実なものは同定されていない。しかし 2012 年末に中国のグループから NTCP (Sodium taurocholate cotransporting polypeptide) というトランスポーターが HBV の新しい受容体として報告された。恐らく、HCV 受容体の場合と同様に、NTCP が単独で受容体として機能するものではなく、複数のタンパクの複合体として機能することが想定される。一般的に、多くの膜表面のタンパク質には糖鎖が存在し、その機能制御に関わることが知られてきた。NTCP にも N 型糖鎖付加部位が 2 箇所存在し、NTCP と複合体を作るタンパク質も糖鎖を持つと想定される。本研究では、細胞表面の糖鎖構造を変化させることによって、HBV の感染性がどのように変化するかを

検討することを手始めとして、その分子機構の解明を目指す。

### B. 研究方法

これまで長年研究を続けて来た 3 つの糖転移酵素 N-アセチルグルコサミン転移酵素 III, V (GnT-III, GnT-V) および  $\alpha$ 1-6 フコース転移酵素(FUT8)を、遺伝子導入によりいくつかの肝がん細胞に過剰発現させた。そして得られたクローン間での HBV の感染性を、名古屋大学の黒田俊一教授が作成した HBV の擬似粒子である Cy3 標識の Bionanocapsule (BNC)を用いて検討したところ、糖鎖変化と HBV の感染性に違いが認められた。平成 24 年度は、糖鎖構造解析法として主にレクチンを用いたが、平成 25 年度は本研究分担者の 1 人である三崎 亮博士と共同で mass spectrometry (LCMS) による解析も行った。また、BNC の取り込み

も平成 24 年度は蛍光顕微鏡による観察で行ったが、平成 25 年度は定量性をもって測定できる flow cytometry 法 (FACS) で検討した。HBV genome を発現させた HB611 とその親株である Huh6 細胞において、著明な糖鎖構造の変化と BNC の感染性に違いを認めため、平成 25 年度は特にこの 2 種の細胞を中心として、BNC 取り込みに影響する糖鎖構造を同定するため、より詳細に検討することとし、実験を精力的に進めた。

(倫理面への配慮) 本研究は、培養細胞レベルの研究なので、臨床サンプルを扱う場合のような倫理面での問題はない。また、遺伝子改変細胞を扱うための、遺伝子組み換え実験の承認は得ている。HBV の細胞実験に関しては、P2 レベルの施設を使用するとともに、大臣承認の実験許可を文部科学省から得ている。

### C. 研究結果

HB611 細胞と Huh6 細胞で BNC の取り込みを FACS で解析したところ、MFI (Mean Fluorescence Intensity) が 2 倍以上 HB611 細胞で上昇していた。そこでいくつかのレクチンを用いてこの 2 つの細胞の糖鎖解析を行ったところ、コア型フコースとシアル酸の増加、バイセクト型および  $\beta$ 1-6 結合 GlcNAc 糖鎖の減少が認められた。一方、ルイス型フコースや ConA 結合型糖鎖には差を認めなかった。バイセクト型糖鎖の減少は、1995 年の J. Biol. Chem. に既に報告している既知の知見のため、今回は増加の著しかったコアフコースとシアル酸に注目することとした。まず、フコシル化関連遺伝

子の発現を real-time PCR で検討したところ、コアフコースを生合成する唯一の糖転移酵素である *FUT8* の発現が 5 倍以上 HB611 細胞で高かった。次に、これらの糖鎖変化が HBV 感染によって誘導されたものか否か検討するために、HB611 細胞をインターフェロン  $\alpha$  で処理したところ、濃度依存性に BNC の取り込みが抑制されるとともに、シアル酸とコアフコース量にも低下が認められた。これらの糖鎖変化が結果なのか原因なのかを知るため、HB611 細胞をシアリダーゼ処理して BNC の感染性を検討した。するとシアリダーゼ処理によって SSA (シアル酸認識レクチン) との結合性は 50% 低下し、BNC の取り込みも 20-25% 低下した。次にウイルスベクターを用いて HB611 細胞の *FUT8* 遺伝子をノックダウンしたところ、PhoSL (コアフコース認識レクチン) との結合性の低下とともに、BNC の取り込みも 10-15% 低下した。また preliminary な実験データではあるが、*FUT8* 遺伝子の発現量と HBV 受容体候補の NTCP の遺伝子発現の間に、相関が認められた。Mass spectrometry による HB611 と Huh6 の細胞表層の糖鎖構造解析結果に関しては、三崎先生の報告書をご参照いただきたい。

### D. 考察

25 年度の研究結果から、HBV の感染には、コアフコースとシアル酸の関与が重要であることが考えられた。ノックダウンおよびシアリダーゼ処理による検討から、これらの糖鎖変化は Huh6 に HBV 遺伝子が導入された結果生じた変化というだけでなく、

もっと能動的に HB611 細胞により BNC が取り込まれやすい原因となっている可能性が推察された。インフルエンザの場合は、自らが産生するシアリダーゼによって感染した細胞から次の細胞へ感染する時に宿主となる細胞のシアル酸を除去する。このシアリダーゼの阻害薬こそがタミフルであり、実際のインフルエンザの治療薬に使われている。HBV が自らのウイルスを感染もしくは増殖させやすい環境に、宿主細胞の糖鎖改変という手段を利用することは十分考えられる。肝がん細胞の表面分子には多くのシアル酸をもつ糖タンパクが存在する。HBV 受容体は複合体であることが想定されるが、これらの中にシアル酸の標的分子が含まれる可能性は十分あり、その同定は、感染メカニズムの解明に非常に大きな一歩となることが予想される。今後の重要な課題である。一方、コアフコースは、ほとんどの膜受容体に存在すると想定されるが、その量の増減によって受容体自体の機能が影響され、下流の細胞内シグナルが変化し、糖鎖とは全く異なるタンパク質の遺伝子発現が誘導される場合がある。まだ preliminary な結果ではあるが、私たちが掴んだ HB611 と親株の Huh6 に見られた FUT8 遺伝子発現と NTCP 遺伝子発現の相関性は、複雑な経路によって NTCP の遺伝子発現が HB611 で増加した可能性も考えられる。26 年度はヒト NTCP 遺伝子をクローニングし、遺伝子工学的に 2 箇所の糖鎖付加部位をつぶしたものととの比較により、NTCP 自体の糖鎖機能についても検討を進める予定である。

## E. 結論

HBV ゲノム遺伝子を導入した HB611 細胞では、親株の Huh6 細胞に較べてコアフコースとシアル酸の量が増加していた。特異的遺伝子のノックダウンやシアル酸消化による検討から、これらの糖(鎖)が疑似 HBV ウイルス粒子である BNC の取り込みに関与している可能性が考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Shinzaki S, Kuroki E, Iijima H, Tatsunaka N, Ishii M, Fujii H, Kamada Y, Kobayashi T, Shibukawa N, Inoue T, Tsujii M, Takeishi S, Mizushima T, Ogata A, Naka T, Plevy SE, Takehara T, **Miyoshi E.** (2013) Lectin-based immunoassay for aberrant IgG glycosylation as the biomarker for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* **19** (2), 321-331.
2. Kamada Y, Kinoshita N, Tsuchiya Y, Kobayashi K, Fujii H, Terao N, Kamihagi K, Koyama N, Yamada S, Daigo Y, Nakamura Y, Taniguchi N, **Miyoshi E.** (2013) Reevaluation of a lectin antibody ELISA kit for measuring fucosylated haptoglobin in various conditions. *Clin. Chim. Acta* **417**, 48-53.
3. Tanaka K, Moriwaki K, Yokoi S, Koyama K, **Miyoshi E.**, Fukase K. (2013) Whole-body imaging of tumor cells by azaelectrocyclization: visualization of metastasis dependence on glycan structure. *Bioorg Med Chem.* **21** (5), 1074-1077.

4. Kimura M, Masui Y, Shirai Y, Honda C, Moriwaki K, Imai T, Takagi U, Kiryu T, Kiso T, Murakami H, Nakano H, Kitahata S, Miyoshi E, Tanimoto T. (2013) Preparation of branched cyclomaltoheptaose with 3-O- $\alpha$ -L-fucopyranosyl- $\alpha$ -D-mannopyranose and changes in fucosylation of HCT116 cells treated with the fucose-modified cyclomaltoheptaose. *Carbohydrate Res.* 374, 49-58, 2013.
5. Onuki K, Sugiyama H, Ishige K, Kawamoto T, Ota T, Ariizumi S, Yamato M, Kadota S, Takeuchi K, Ishikawa A, Onodera M, Onizawa K, Yamamoto M, Miyoshi E, Shoda J. (2013) Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in the subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder. *J Gastroenterol.* 2013 Apr 17 in press.
6. Kamada Y, Fujii H, Fujii H, Sawai Y, Doi Y, Uozumi N, Mizutani K, Akita M, Sato M, Kida S, Kinoshita N, Maruyama N, Yakushijin T, Miyazaki M, Ezaki H, Hiramatsu N, Yoshida Y, Kiso S, Imai Y, Kawada N, Takehara T, Miyoshi E. (2013) Serum Mac-2 binding protein levels as a novel diagnostic biomarker for prediction of disease severity and nonalcoholic steatohepatitis. *Proteomics Clin Appl* in press.
7. Kamada Y, Akita M, Takeda Y, Yamada S, Fujii H, Sawai Y, Doi Y, Asazawa H, Nakayama K, Mizutani K, Fujii H, Yakushijin T, Miyazaki M, Ezaki H, Hiramatsu N, Yoshida Y, Kiso S, Imai Y, Kawada N, Takehara T, Miyoshi E. (2013) Serum fucosylated haptoglobin as a novel diagnostic biomarker for predicting hepatocyte ballooning and nonalcoholic steatohepatitis. *PLOS One* 8 (6), e66328.
8. Nakayama K, Moriwaki K, Imai T, Shinzaki S, Kamada Y, Murata K, Miyoshi E. (2013) Mutation of GDP-mannose-4,6-dehydratase in colorectal cancer metastasis. *PLOS One* 8 (7), e70298.
9. Azuma K, Shinzaki S, Asazawa H, Kuroki E, Kawamoto S, Kamada Y, Hayakawa K, Miyoshi E. (2013) Twin studies on the effect of genetic factors on serum agalactosyl immunoglobulin G levels. *Biomedical Reports* in press.
10. Seto K, Uchida F, Baba O, Yamatoji M, Karube R, Warabi E, Sakai S, Hasegawa S, Yamagata K, Yanagawa T, Onizawa K, Miyoshi E, Shoda J, Bukawa H. (2013) Negative expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis. *Springerplus.* 2013 Dec 6;2:657.
11. Tanemura M, Miyoshi E, Nagano H, Eguchi H, Taniyama K, Kamiike W, Mori M, Doki Y. (2013) Role of  $\alpha$ -gal

epitope/anti-Gal antibody reaction in immunotherapy and its clinical application in pancreatic cancer. *Cancer Sci.* **104** (3), 282-90. (review)

和文総説

糖鎖を用いた肝癌幹細胞の単離とその生物学的特性

寺尾尚子、奥戸久美子、森脇健太、三善英知 *消化器内科* **56**(3), 292-300, 2013

糖鎖がんマーカー 三善英知、鎌田佳宏、魚住尚史、*実験医学* **31**(10), 58-64, 2013

2.学会発表

第 103 回アメリカ癌学会 (AACR) April 6-10 in Washington DC, USA

Nakayama K, Moriwaki K, Shimomura M, Fujii H, Takamatsu S, Kamada Y, Murata K, Miyoshi E.

Clinical significance of GDP-mannose-4, 6-dehydratase mutation and loss of fucosylation in colorectal cancer. April 9 ポスター発表

Tanemura M, Miyoshi E, Tanida T, Nagano H, Eguchi H, Furukawa K, Nonaka Y, Akita H, Hama N, Wada H, Kawamoto K, Kobayashi S, Taniyama K, Kamiike W, Mori M, Doki Y. Significant protection against gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells with tumor lysate vaccine, engineered express  $\alpha$ -gal epitopes April 10 ポスター発表  
2013 アメリカ消化器病学会 May 18-21 in

Florida, USA

Fujii H, Shinzaki S, Ishii M, Kamada Y, Iijima H, Tsujii M, Takehara T, Miyoshi E.

Deficiency of fucosylation as a protective role for intestinal inflammation

May 18 ポスター発表

2013 アメリカ糖鎖生物学会 November 17-20, 2013 St. Petersburg, Florida, USA

Miyoshi E, Asazawa H, Akita M, Takeda Y, Takamatsu S, Kamada Y.

Analysis of serum fucosylated haptoglobin in chronic liver diseases as a potential biomarker of hepatocellular carcinoma development.

11/20 ポスター発表

シンポジウム、招待講演

第 72 回 日本癌学会学術総会 平成 25 年 10 月 3-5 日 パシフィコ横浜

Miyoshi E, Takamatsu S, Kamada Y.

Fucosylated haptoglobin is a novel type of cancer biomarker: a possible implication for a diagnosis of hepatoma

国内学会

第 49 回日本肝臓学会総会 6/6-6/7 2013 京王プラザホテル (東京)

鎌田佳宏、藤井英樹、澤井良之、土井喜宣、水谷佳代、木下憲明、今井康陽、河田則文、竹原徹郎、三善英知.

血中 Mac-2 binding protein 値は新たな NASH 鑑別、病期進展のマーカーである  
第 32 回日本糖質学会年会 国際交流センター (大阪) 8/5-8/7

8/6 ポスター

寺尾尚子、高松真二、峰平朋実、森脇健太、  
鎌田佳宏、三善英知

膵がんの Gemcitabine 耐性細胞とがん幹細胞に共通する糖鎖構造の同定

高橋志郎、白井亮平、伊藤 潤、三善英知、  
中堅三弥子

種々のがんにおける血清ハプトグロビンの糖鎖構造解析

8/7 ポスター

東加奈子、奥戸久美子、寺尾尚子、森脇健太、高松真二、鎌田佳宏、世良田 総、仲 哲治、三善英知

がん幹細胞に特徴的な糖鎖のキャリア分子の同定

8/6 ワークショップ 4

三善英知 フコシル化のがん生物学

第 8 回臨床検査学教育学会 平成 25 年 8 月 26-28 日 大阪大学

水谷佳代、鎌田佳宏、藤井宏修、秋田真彩、佐藤元哉、木田祥穂、高松真二、三善英知  
8/27 口頭発表

非アルコール性脂肪性肝炎の新たな血液診断マーカーとしての Mac2-binding protein (Mac-2BP)

片岡直也、石井真悠子、新崎信一郎、藤井宏修、竜中法佳、高松真二、鎌田佳宏、三善英知 8/28 口頭発表

N-アセチルグルコサミン転移酵素 V

(GnT-V)が炎症性腸疾患の病態に及ぼす影響に関する検討

下村真由香、中山小太郎純友、寺尾尚子、小林夕香、中堅三弥子、鎌田佳宏、村田幸平、三善英知 8/28 口頭発表  
コアフコース認識レクチン PhoSL を用いた新規腫瘍マーカー測定法の開発

臨床検査学科目別分科会 三善英知、松尾収二

第 86 回日本生化学会 2013 年 9 月 11-13 日 パシフィコ横浜

油谷美寿季、寺尾美香、加藤亜里沙、室田浩之、片山一朗、三善英知 9/13 口頭発表  
Oligosaccharide modification by N-acetylglucosaminyltransferase-V promotes skin sclerosis by inducing macrophages to shift toward M2

秋田真彩、鎌田佳宏、水谷佳代、藤井宏修、佐藤元哉、木田祥穂、浅澤瞳美、中山小太郎純友、三善英知 9/13 口頭発表  
非アルコール性脂肪性肝炎の鑑別診断における血中フコシル化ハプトグロビン測定の有用性について

第 72 回 日本癌学会学術総会 平成 25 年 10 月 3-5 日 パシフィコ横浜

峰平朋実、魚住尚史、浅澤瞳美、藤井宏修、高松真二、鎌田佳宏、田中克典、深瀬浩一、三善英知 10/5 ポスター発表

CA19-9 の輸送に関わる新規膜複合体構成

## 蛋白質の機能解析

高松真二、大坪和明、藤井宏修、鎌田佳宏、三善英知、谷口直之 10/5 口頭発表  
糖転移酵素 GnT-III 発現のレドックス制御  
と食食能に及ぼすメカニズムの解析

第 60 回日本臨床検査医学会学術総会 平  
成 25 年 10 月 31 日～11 月 3 日

神戸国際会議場

木田祥穂、鎌田佳宏、佐藤元哉、藤井宏修、  
水谷佳代、秋田真彩、高松真二、吉田雄一、  
竹原徹郎、三善英知 11/1 口頭発表  
N-アセチルグルコサミン転移酵素(GnT-V)  
の HDL 新生に及ぼす作用

東加奈子、寺尾尚子、山崎美佳、高松真二、  
鎌田佳宏、三善英知 11/1 口頭発表  
がん幹細胞に特徴的な糖鎖のキャリア分子  
の同定

水谷佳代、鎌田佳宏、藤井宏修、秋田真彩、  
佐藤元哉、木田祥穂、高松真二、三善英知  
11/2 口頭発表

Mac-2 binding protein は非アルコール性脂  
肪性肝炎の新たな血液診断バイオマーカー  
である

第 40 回肝臓学会西部会 平成 25 年 11 月  
6-7 日 長良川国際会議場

木田祥穂、鎌田佳宏、佐藤元哉、藤井宏修、  
水谷佳代、秋田真彩、高松真二、吉田雄一、  
竹原徹郎、三善英知 11/7 口頭発表

N-アセチルグルコサミン転移酵素 V

(GnT-V) の過剰発現は、肝臓での HDL 新  
生を促進する

佐藤元哉、鎌田佳宏、木田祥穂、藤井宏修、  
石井真悠子、吉田雄一、竹原徹郎、三善英  
知 11/6 口頭発表

N-アセチルグルコサミン転移酵素 V  
(GnT-V) の Concanavalin A 誘導性肝炎に  
おける役割

第 42 回日本免疫学会 平成 25 年 12 月 11  
～13 日 幕張メッセ (千葉)

藤井宏修、新崎信一郎、飯島英樹、辻井正  
彦、竹原徹郎、三善英知  
12/12 ポスター発表

Altered Oligosaccharide Structures Reduce  
Colitis Induction in Mice Defective in  
 $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase1

招待講演

第 72 回 日本癌学会学術総会シンポジウ  
ム 平成 25 年 10 月 3 日 パシフィコ横浜  
三善英知、高松真二、鎌田佳宏

新しい糖鎖がんマーカー、フコシル化ハプ  
トグロビンの肝がん診断への可能性

第 11 回 糖鎖科学コンソーシアムシンポ  
ジウム 生活習慣病と糖鎖科学

平成 25 年 10 月 26 日 東北薬科大学 (仙  
台)

三善英知 糖鎖科学による膵がんへの挑戦

G.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

第 14 回関西グライコサイエンスフォーラム  
△優秀発表賞

東加奈子、奥戸久美子、寺尾尚子、森脇健太、鎌田佳宏、世良田総、仲 哲治、三善英知 糖鎖を用いたがん幹細胞の単離とその機能解析

社会貢献

第 66 回日本臨床化学会近畿支部例会 教育講演

三善英知 肝臓の病気と糖鎖

日時：6月1日（土）午後 会場：宝塚大学 梅田キャンパス

第 24 回 大阪若手がんセミナー 主催者 三善英知、井上正宏、猪原秀典

平成25年7月16日 千里阪急ホテル クリスタルホール

北野高校キャリアガイダンス 平成 25 年 11 月 7 日 北野高校

医師と研究 三善英知

第 3 回グライコサイエンスセミナー

主催者 三善英知

革新的な抗体作成技術とその応用

東北大学大学院医学系研究科教授 加藤幸成 平成 25 年 11 月 27 日 大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻

## HBV 感染機構に寄与する HBV 表面抗原由来糖鎖構造の解析

研究分担者 三崎 亮

大阪大学生物工学国際交流センター 講師

研究要旨：これまでに、糖鎖はタンパク質の分解からの保護や生理活性に寄与するだけではなく、癌の悪性化など病態とも密接に関わることが分かってきた。いくつかのウイルス感染とも密接な関係にあることが指摘されており、HBV に関してもその感染に糖鎖が必要であることが報告されている。しかし、実際にウイルスもしくは宿主細胞由来のどのような糖鎖構造がウイルス感染や病態発症機構に寄与するのかについては明らかにされていない。本研究課題では、「*in vitro* 糖鎖改変技術」「糖鎖構造解析技術」「タンパク質細胞内輸送経路解析技術」の3技術を駆使することで、ウイルスおよび宿主細胞由来糖鎖構造とHBV 病態発症機構との関係解明に迫り、「糖鎖を標的とした治療戦略の開発」を目指す。

### A. 研究目的

本研究では、HBV 表面抗原糖鎖の改変とHBV 感染細胞の糖鎖修飾変動からHBV 病態発症機序の解明を行い、糖鎖を標的とした創薬を目指す。

研究代表者が開発したHBV 膜粒子を被覆した擬似HBV (HBV pseudotype particle: HBVpp) が感染系の構築に有効な材料であるため、HBVpp 発現細胞の培養液中よりHBVpp を大量精製し、*in vitro*にて糖鎖改変を目指す。HBVpp の作成が上手くいかない場合も考慮し、他研究分担者が酵母にて作成したHBV 表面抗原 (HBsAg) を表面に提示した精製済 baio-nanocapsule (BNC) を利用することも視野に入れる。また、当研究分担者サイドでも昆虫細胞・バキュロウイルス

発現系を利用してHBVpp の作成を行う。最終的に糖鎖構造を任意に改変したHBVpp の感染能力と細胞内での動態を解析する。

また、HBV 感染が宿主細胞の糖鎖分布および糖鎖修飾関連酵素の発現量にどのような影響を及ぼすのかを調査する。他研究分担者と共同してHBVpp 感染、非感染細胞の糖鎖プロファイルを作成し、ウイルス感染による糖鎖修飾の変動を追跡する。

### B. 研究方法

#### ○HBVpp の構築と精製

HBVpp 発現用ベクターを25 cm<sup>2</sup> フラスコ10 mL の血清入り培地にて培養したヒト肝癌細胞由来ウイルスパッケージング細胞に形質導入した。形質導入2日後に、培地を

無血清培地 10 ml に変換し、更に 5 日間培養を行った。得られた培養液と細胞を遠心分離し、抗 HBsAg 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより両画分に含まれる HBVpp を検出した。HBVpp の生産が認められた培養液 5 ml について、225 cm<sup>2</sup> フラスコで培養したヒト肝癌細胞由来ウイルスパッケージング細胞培養液 100 ml に添加し、7 日間培養後、培養液から HBVpp の精製を試みた。

回収した培養液に対して、PEG8000 を 6% となるように加え 4°C で 16 時間静置した。遠心分離により沈殿を回収し、5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8) 中に沈殿を再懸濁した。再懸濁液を遠心分離し、得られた上清をフィルター濾過した。上記リン酸ナトリウム緩衝液で平衡化したヒドロキシアパタイトカラムに濾液を供し、同緩衝液でカラムを洗浄した。続いて、緩衝液濃度を 50 mM ずつ段階的に上げた溶出液を供し、目的 HBVpp の溶出を行った。

BNC については、糖鎖改変を行う前に実際にどのような糖鎖が付加されているのかを確かめる必要があるため、後述する方法に従って糖鎖構造解析を行った。

一方、昆虫細胞を利用した HBVpp の作成を試みた。バキュロウイルスタンパク質組換え生産系を利用するため、まず HBsAg 発現ベクターの構築を行った。次に、生産宿主として選抜した Sf9 細胞を 6 穴プレートにて血清入り培地で培養し、構築した発現ベクターを用いて形質導入を行った。3 日間培養を行った後、得られた培養液と細胞を遠心分離し、抗 HBsAg 抗体を用いたウエ

スタンブロッティングにより両画分に含まれる HBsAg を検出した。

○糖鎖プロファイルの作成 (HBV ゲノム遺伝子を保持するヒト肝癌細胞 Huh6 (HB611) の糖鎖構造解析)

培養後の細胞を PBS で十分に洗浄し、アセトンを添加することで脱脂、脱水を行い糖タンパク質試料とした。乾燥後、糖タンパク質に *N*-グリコシダーゼ F を添加、37°C で 24 時間インキュベートすることで糖鎖の切り出しを行った。セルロースカートリッジを利用して切り出した糖鎖を精製後、糖鎖に 2-アミノピリジンを付加し還元することで糖鎖のピリジルアミノ (PA) 化蛍光標識を行った。次に、試料をフェノール・クロロホルム抽出し、未反応 2-アミノピリジンを除去後、再度セルロースカートリッジに供し PA 化糖鎖を精製した。糖鎖構造の分析には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) および液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) を用いた。上記において調製した PA 化糖鎖を陰イオン交換カラムを用いた HPLC に供した (酸性糖の分離・精製)。得られたピークを回収し乾燥後、続いてオクタデシルシリルカラムを用いた逆相 HPLC に供した (中性糖の分離・精製)。同様に得られたピークを回収し、アミノカラムを用いた LC/MS に供して糖鎖の分子量を決定した。更に、MS/MS を行うことで糖鎖構造を解析した。対象実験に野生型 Huh6 細胞を用いることで、糖鎖構造の比較を行った。

○糖鎖プロファイルの作成 (BNC の糖鎖構造解析)

十分に乾燥した BNC に対して無水ヒドラジンを添加、100°C で 10 時間インキュベートすることで糖鎖の切り出しを行った。過剰量のアセトンを添加し、遠心分離により得られた沈殿に対し、飽和炭酸水溶液および無水酢酸を添加することで、糖鎖の *N*-アセチル化を行った。陽イオン交換カラムクロマトグラフィーおよびセルロースカートリッジを利用して糖鎖を精製した。2-アミノピリジンを用いた糖鎖の蛍光標識および HPLC、MS を利用した構造解析は上述した Huh6 細胞糖鎖構造解析の手順に従った。MS 分析については、糖鎖分子量が大きいためマトリックス支援レーザー脱離イオン化法飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF-MS) も使用した。

○HBVpp 発現細胞における糖鎖修飾酵素遺伝子の発現量の解析

HBVpp を発現したヒト肝癌細胞由来ウイルスパッケージング細胞より mRNA を抽出し、これを基に合成した cDNA を鋳型として定量 RT-PCR を行った。発現量解析の標的遺伝子として、分岐型糖鎖合成に関わる  $\alpha$ 1,6-フコース転移酵素、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 III および V 各遺伝子を選抜した。

(倫理面への配慮)

本研究課題で使用する研究材料については、培養細胞等について一般的なものであり個人情報を含むものは無い。また、遺伝

子組換え実験の対象となるため、実験開始前に大阪大学に組換え実験計画書を提出、承認を得ている。よって、倫理面での問題は無い。

C. 研究結果

○HBVpp の構築と精製

抗原認識部位の異なる数種の抗 HBsAg 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った結果、ヒト肝癌細胞由来ウイルスパッケージング細胞を利用することで培地 1 ml あたり数十~数百 ng 程度の PreS1 および PreS2 領域を持つ HBVpp を生産できた。一方で、精製の課程での HBVpp 喪失量が大きいかも判明した。

バキュロウイルススタンパク質組換え生産系では、発現ベクターを形質導入した宿主細胞内において PreS1 領域を保持する HBsAg の生産を認めたが、培地への分泌は確認できなかった。

○糖鎖プロファイルの作成 (HBV ゲノム遺伝子を保持するヒト肝癌細胞 Huh6 の糖鎖構造解析)

HB611 と野生型 Huh6 細胞由来全糖タンパク質糖鎖の構造解析を行った。この結果、まず野生型 Huh6 細胞からは、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、マンノース (Man)、ガラクトース (Gal)、シアル酸 (Sia) から成る以下の糖鎖  $\text{Man}_{8-9}\text{GlcNAc}_2$  (71.6%)、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (6.8%)、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (1.6%)、 $\text{GalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  (1.9%)、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (11.6%)、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  (3.5%)、

Gal<sub>3</sub>GlcNAc<sub>3</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> ( 1.6% ) 、  
SiaGalGlcNAcMan<sub>4</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (1.3%) が得られ  
た。これに対し HB611 細胞からは、フコー  
ス (Fuc) 結合糖鎖を含む Man<sub>5-9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>  
(63.1%)、GalGlcNAcMan<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (1.1%)、  
GalGlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> ( 1.4% ) 、  
Man<sub>3</sub>FucGlcNAc<sub>2</sub> ( 2.7% ) 、  
GalGlcNAcMan<sub>3</sub>FucGlcNAc<sub>2</sub> ( 0.9% ) 、  
GalGlcNAcMan<sub>4</sub>FucGlcNAc<sub>2</sub> ( 4.6% ) 、  
GalGlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>FucGlcNAc<sub>2</sub> ( 2.9% ) 、  
Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>FucGlcNAc<sub>2</sub> ( 18.8% ) 、  
SiaGal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>FucGlcNAc<sub>2</sub> (1.8%) が得  
られた。HB611 細胞由来の糖鎖からは、Huh6  
細胞では見られなかったフコース結合糖鎖  
が全体の 31.7%を占める結果となった。

また、他研究分担者が構築した、分岐型  
糖鎖を合成する酵素 *N*-アセチルグルコサ  
ミン転移酵素 III および V を過剰生産する  
ヒト肝癌細胞 Hep3B 株 (それぞれ  
Hep3B-GnT-III および Hep3B-GnT-V) の糖鎖  
構造解析を行った。Hep3B-GnT-III 細胞由  
来の糖鎖からは、野生型 Hep3B 細胞では見  
られなかった bisect 型糖鎖が全糖鎖構造  
の中で 5.1%を占め、Hep3B-GnT-V 細胞由来  
の糖鎖からは、Hep3B 細胞では僅かに 0.41%  
を占めた tri-antenna 型糖鎖が 22.2%まで  
増加していることが分かった。

#### ○糖鎖プロファイルの作成 (BNC の糖鎖構 造解析)

出芽酵母に見られる典型的なマンノース  
を複数保持する糖鎖の存在が確認できた。  
ヒトをはじめとするガラクトースやシアル  
酸の付加した動物型の糖鎖の存在は認めら

れなかった。

#### ○HBVpp 発現細胞における糖鎖修飾酵素遺 伝子の発現量の解析

HBVpp を発現するヒト肝癌細胞由来ウイ  
ルスパッケージング細胞から調製した  
cDNA を用いて qRT-PCR を行ったところ、  
 $\alpha$ 1,6-フコース転移酵素、*N*-アセチルグル  
コサミン転移酵素 III および V いずれの遺  
伝子についても発現量は野生型細胞と比較  
して大きな違いは見られなかった。

#### D. 考察

*in vitro* 糖鎖改変には mg オーダーの  
HBVpp 量が必要であるため、昨年度よりヒ  
ト肝癌細胞由来ウイルスパッケージング細  
胞を用いて精製 HBVpp の確保に努めている  
が、現状では必要量の調製に時間を有する  
と判断した。

これに対して、BNC は酵母を宿主に生産  
するためスケールアップが簡便であり、必  
要量の確保が容易であると考えられる。BNC  
の糖鎖構造を解析した結果、非還元末端に  
多数のマンノースを持つ典型的な酵母型の  
糖鎖構造を持つことがわかった。このよう  
な糖鎖構造は *in vitro*での糖鎖構造改変が  
可能である。以上を踏まえ、次年度以降は  
BNC を中心に糖鎖構造の改変を行う予定で  
ある。

バキュロウイルス生産系を利用した昆虫  
細胞での HBVpp 生産については、HBsAg の  
生産を確認できた。次のステップとして、  
バキュロウイルス表面に HBsAg が提示され  
ているかどうかを検証する。また、HBsAg