

図 2

NおよびO結合型糖鎖構造のMSシグナルの相対強度による比較解析（上段：N結合型糖鎖構造、下段：O結合型糖鎖構造）

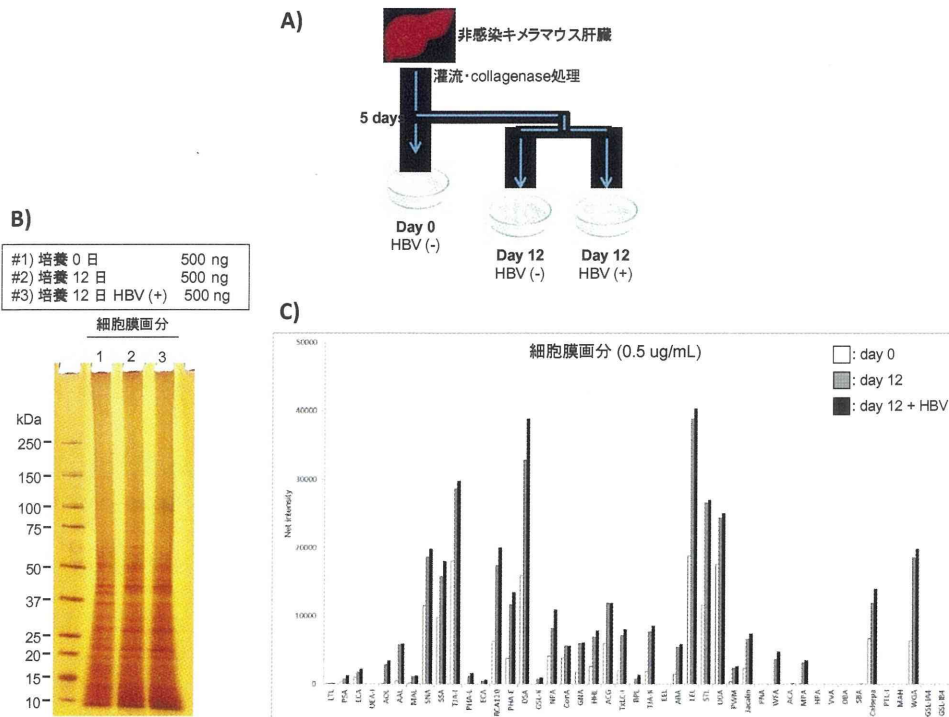


図 3

HBV(genotype C)感染前後の宿主側糖鎖解析。(A)ヒト肝臓化キメラマウスからの初代培養肝細胞ならびに、HBV非感染・感染細胞の調製、(B)解析に使用した肝細胞（宿主細胞）の膜タンパク質のSDS-PAGE（銀染色）結果、(C)レクチンアレイ解析による糖鎖プロファイル。

## D. 考察

現在までに、基本的な情報を取得するための下地が整い、肝細胞および培養細胞株の遺伝子発現や糖鎖構造、内在性レクチン様ドメイン含有タンパク質などの情報が得られている。宿主細胞との関連を見るために、一部 SVP（課題 1 とも関連）なども糖鎖構造解析を行っている。今後はさらに試料を拡充して、感染前後あるいは経時的な宿主細胞の変化などにおいて同様の解析をすることで、HBV 感染と宿主細胞側の糖鎖発現との関連性がより詳細に検討できると考えられる。

また、本研究で得られる宿主細胞における糖鎖遺伝子/糖鎖関連遺伝子の発現解析の結果は、他課題（課題 1 や課題 3：HBV-宿主細胞における糖鎖の役割、課題 4：糖鎖改変の HBV の増殖・感染能への影響）研究の基礎知見となると考えられる。

## E. 結論

肝臓細胞株における遺伝子解析、糖鎖構造解析（糖鎖プロファイル解析）、ならびにグライコプロテオーム解析データを利用したレセプター候補探索などを行った。基本的な糖鎖の構造情報、糖鎖関連遺伝子の発現情報および細胞表面

タンパク質の発現情報などを得ることが出来た。これらの知見を基に、今後行う予定にしている、（感染有無での）ヒト肝臓化マウス組織・細胞を対象としたより詳細な解析と比較しながら検討を行うことで、統合的に HBV 感染の糖鎖合成への影響を捉えていきたいと考えている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

### HBV-宿主細胞における糖鎖の役割

館野浩章 産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター  
佐藤 隆 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター

研究要旨：本課題では、宿主細胞上における HBV 糖鎖と相互作用する糖鎖認識分子（内在性レクチン）の探索を進めることにより、HBV-宿主細胞間相互作用機構を糖鎖という視点から理解することを目的とする。本年度は HBV 側の糖鎖に着目し、糖タンパク質である HBs-S の発現系の構築および、N型糖鎖付加機能の解明を行った。また内在性レクチンの探索も継続して行い、正常ヒト肝細胞と培養肝がん細胞の遺伝子発現解析より正常ヒト肝細胞でのみ発現するレクチン候補分子を複数個見出し、組換え体を作製し HBs との結合を検討した。

#### A. 研究目的

HBsAg は翻訳開始メチオニンが異なる 3 種類のアイソフォーム HBs-L, HBs-M, HBs-S が知られており (Figure 1A)、HBV 粒子中ではそれらが異なる割合で混在する事が示唆されている。3 種類のアイソフォームの共通部分である HBs-S は、4 カ所の膜貫通領域が予想され、ループ領域に 1 カ所の N 型糖鎖付加部位を有している (Figure 2A 矢印)。B 型肝炎ウイルス感染患者血清より粗精製したウイルスでは、N 型糖鎖付加されたものとされないものが 1:1 の割合で生成されることが報告されている。我々は HBsAg の糖鎖構造解析を行う目的でリコンビナント HBsAg の発現を行い、リコンビナント HBs-S でも N 型糖鎖付加が同様の割合で起こる事を見出した。ループ領域の N 結合型糖鎖は、ウイルス粒子の分泌や DNA の取り込み等に関与していることが示唆されており、N 型糖鎖付加の起こり方を解析することは、HBV ウイルス粒子形成のメカニズムを理解し、創薬ターゲットを絞り込む上で重要であると考えられる。そこで、リコンビナント HBs-S を用いてウイルス

粒子形成と N 型糖鎖付加の関係を解析した。

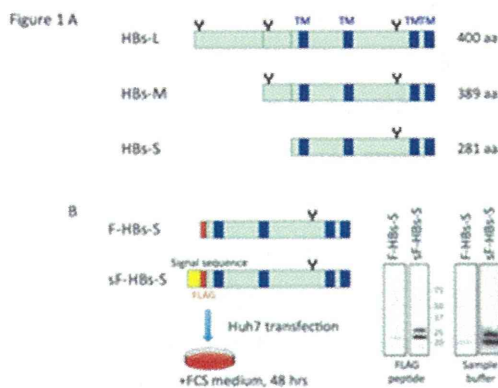
#### B. 研究方法

第 1 にリコンビナント HBs-S を糖鎖付加のインディケーターとして、培養細胞を用いた高効率な HBs-S 発現系を構築する。第 2 に N 型糖鎖付加に影響する因子として、分子内ジスルフィド結合、膜タンパク質の配向性などに焦点を当て、分子生物学的手法により改変した HBs-S を発現させ、N 型糖鎖付加への影響を調べる。

#### C. 研究結果

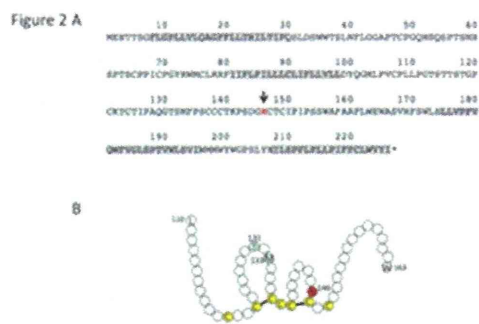
(1) リコンビナント HBs-S の高効率発現：最初に分子生物学的手法を用いて、リコンビナント HBsAg の高発現系の精製法の検討を行った。HBsAg を B 型肝炎ウイルス感染患者血清中や遺伝子工学的手法で発現させた培養上清中より高収率に精製可能な抗体を検索したが、市販の抗体では精製は不可能であったことから、HBs-S の N 末端と C 末端に精製用の FLAG Tag を導入したリコンビナント HBs-S の発現を行った。テンプレート HBs-S DNA は名古屋

市立大学より供与頂いた genotype-C を用い、PCR で FLAG 配列を付加したものを発現ベクター-pcDNA3.1(Invitogen)に組換えた。作製し

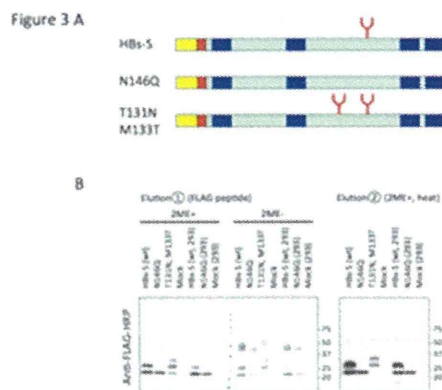


た発現ベクターを Huh7 細胞にトランスフェクションして、48 時間後に培養上清を回収し、抗 FLAG 抗体-agarose(Sigma-aldrich)を用いてリコンビナント HBs-S を吸着した。抗 FLAG 抗体からの溶出は 2 段階で行い、最初に FLAG ペプチドで競合溶出、その後、SDS-PAGE サンプルバッファを加え、100°C 加熱により溶出回収した。回収したリコンビナント HBs-S を SDS-PAGE で展開し、抗 FLAG 抗体でウエスタンブロットした結果、*N*型糖鎖付きの gp28 と *N*型糖鎖のない p25 の 2 本のバンドが検出された(Figure 1B, F-HBs-S)。しかしながら、バンド強度は検出限界ぎりぎりであった。糖鎖構造解析のためにはより多くの HBs-S を発現させる必要があるため、FLAG 付きの HBs-S コンストラクトの N 末端にシグナル配列を導入し、強制的に培養上清に分泌させる発現系を作製した。具体的には、HBs-S 全長をコードする遺伝子を分泌発現用ベクター pFLAG-CMV3(Sigma-aldrich)に組換え、同様に Huh7 を用いて発現、精製を行った。その結果、強制分泌の系では、分泌シグナルのない発現系に比較しておよそ 10 倍量の精製 HBs-S を回収できることがわかった(Figure 1B, sF-HBs-S)。また、強制分泌の系を用いた場合でも、*N*型糖鎖付加の割合は 1:1 に維持さ

れることも確認された。これらの結果より、リコンビナント HBs-S の高発現系を構築できたと判断し、強制分泌の系を用いて以後の実験を行った。



(2) *N*型糖鎖付加部位改変のウイルス産生への影響:*N*型糖鎖のウイルス産生に対する影響を調べるために、ループ領域に存在する *N*型糖鎖付加部位 (146N) にアスパラギンをグルタミンに置換する変異を導入した (N146Q) (Figure 2A, B)。また、伊藤らが genotype-A で報告している *N*型糖鎖付加部位が 2 箇所が増える変異も導入するために、T131 を N、133M を T に改変した HBs-S 発現ベクター (T131N, M133T) を構築し、Huh7 と HEK293T 細胞にて発現させ、培養上清中より精製後ウエスタンブロットを行った。その結果、Huh7 と HEK293 細胞において、N146Q は予想通り *N*型糖鎖付加のない p25 のバンドのみが検出され(Figure 3A, B)、改めて gp28 は p25 に *N*型糖鎖が付加したものである事が明らか



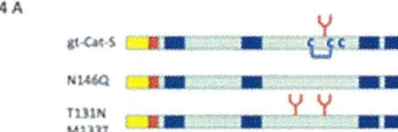
となった。続いて、T131N, M133T 変異体では、gp28 よりも大きな分子量の位置に新たなバンドが検出され、これは 2 本の *N*型糖鎖が付加した HBs-S であると予想される。一方、変異を導入しない HBs-S で確認された *N*型糖鎖付加体と糖鎖なしの 1:1 の割合は変化し、糖鎖なしの割合が大きく減少した(Figure 3B)。これらの結果は、T131N, M133T 変異により新たに導入した *N*型糖鎖付加配列により、本来の HBs-S で確認された *N*型糖鎖付加体と糖鎖なしの両方に新たな *N*型糖鎖を付加させることができた可能性が考えられた。また、HBs-S はループ領域に 7 つのシステイン(C)残基を有しており、分子内や分子間で複雑にジスルフィド結合を形成している可能性が考えられたため、β-メルカプトエタノール (2ME) 処理の有無でウエスタンブロットのシグナルを比較した。その結果、2ME 処理なしの場合は、糖鎖なし、1 本の *N*型糖鎖を持つもの、2 本の *N*型糖鎖を持つもの、それぞれにおいて 2 量体の位置にバンドが確認された。以上の結果より、HBs-S は分子間で 2 量体を形成している可能性が考えられた(Figure 3B)。

### (3) ジスルフィド結合の糖鎖付加への影響：

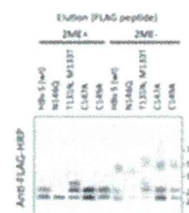
HBs-S のループ領域のシステイン残基は、124C-137C、139C-147C の 2 箇所分子内ジスルフィド結合を形成することが知られている(Figure 2B)。この中で 147C は *N*型糖鎖付加部位 146N の直後に存在することから、小胞体におけるジスルフィド結合の形成とオリゴ糖転移酵素による *N*型糖鎖前駆体付加が競合している可能性が考えられた。そこで C147 および C149 をアラニンへ変換した変異体を作製し、HBs-S の糖鎖付加への影響について検討した。もし、ジスルフィド結合と糖鎖付加が競合していれば、システイン残基を改変した C147A では、より効率的に糖鎖付加が起こる

事が期待される。上記と同様に PCR で変異を導入した遺伝子を作製し、Huh7 にトランスフェクションして培養上清に分泌される変異 HBs-S をウエスタンブロットにより解析した。その結果、C147A であっても *N*型糖鎖付き HBs-S と糖鎖なしのものが 1:1 の割合で精製された(Figure 4)。この結果は、147C の分子内ジスルフィド結合は糖鎖付加には影響していないことを示唆するものである。同様に 147C のジスルフィド結合のパートナーである 139C や 147C に隣接する 149C に変異を導入したが、結果は 147C と同じ結果であった(Figure 4B, 5B)。

Figure 4 A



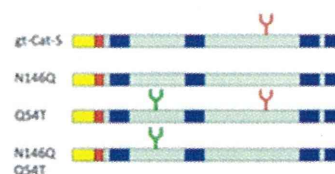
B



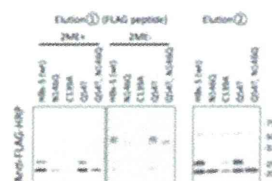
### (4) 膜タンパク質配向性の糖鎖付加への影響：

小胞体の膜タンパク質であると考えられている HBs-S で、*N*型糖鎖付加体と糖鎖なしの分子が 1:1 の割合で生じる理由として、膜タンパク質の配向性との関係を検討した。HBs-S の翻訳過程で配向性の異なる 2 種類の分子がラ

Figure 5 A



B



ンダムに生成していると仮定すると、一方は *N* 型糖鎖付加部位 146N が小胞体内腔側に存在するため糖鎖修飾が起こり、もう一方では 146N が細胞質側にあるため糖鎖修飾が起こらない可能性が考えられる。そこで、146N が細胞質側にある場合に、小胞体内腔に存在するループに *N* 結合型糖鎖付加のコンセンサス配列を導入し、新たに導入した部位に糖鎖が結合するかどうかを調べた。具体的には、54Q を 54T になる変異を導入し、新たな *N* 結合型糖鎖付加部位 NST を導入した。同様に Huh7 に発現させた結果、54T を導入し、本来の *N* 型糖鎖付加部位を欠失した Q54T, N146Q では、糖鎖付加なしの p25 のバンドのみ検出され、新たに導入した *N* 結合型糖鎖付加部位には糖鎖修飾されなかった (Figure 5B)。このことは、HBs-S 産生において、配向性の異なる分子が生成される可能性を否定する結果である。

#### D. 考察

HBs-Ag はウイルス粒子表面の膜タンパク質であり、その由来は細胞質でアッセンブルされたコア構造が小胞体に取り込まれる際に小胞体膜を表面にまとったものであると考えられている。今回、我々は HBs-S の培養細胞での効率的な発現系構築と、tag を活用した培養上清からの精製法の確立に成功した。培養上清中の HBs-S の分子動態は明らかになっていないが、HBs-S が 4 回膜貫通領域を持った膜タンパク質であること、限外ろ過で 250 KDa 以上の高分子量画分に存在することなどから、膜に会合し粒子を形成しており、tag 精製は粒子の状態での精製している可能性が考えられる。また、分子は単量体もしくは 2 量体で存在し、*N* 型糖鎖が付加したものと糖鎖がないものが 1:1 の割合で含まれていることも特徴として挙げられる。HBs-S の翻訳と協調した膜への会合、ジスルフィド結合による 2 量体の形成および *N* 型糖鎖付加は小胞体で

起こる事が予想されるが、今回の解析からジスルフィド結合による糖鎖付加への影響は確認されなかった。ウイルス粒子表面で HBs-S 分子がどのような状態で存在しているのかは未だ未解明である。特に *N* 型糖鎖が付加したものと糖鎖がないものが 1:1 の割合で生じることに関して、*N* 型糖鎖が付加したものと糖鎖がないものが会合して 2 量体を形成しているのか、糖鎖付きのもの同士の 2 量体と糖鎖がないものの 2 量体が等量発現しているのかは大変興味深いところである。今後はこれらのウイルス粒子の生成過程における糖鎖付加のメカニズムを詳細に解析し、ウイルス形成を阻害する薬剤の開発に繋げたい。

#### E. 結論

リコンビナント HBs-S の高収率の発現系を確立した。HBs-S の *N* 型糖鎖付加について、分子内ジスルフィド結合、膜タンパク質の配向性について検討し、どちらも影響のない事がわかった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

(14) Sato T, Tateno H, Angata K, Kaji H, Narimatsu H. Endogenous Lectins as Co-receptors for HBV Infection TASL-Japan Hepatitis B Workshop. Taipei. 2014/04/19-20

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業））  
分担研究報告書（平成25年度）

糖鎖変異のHBVの増殖・感染能への影響

米田政志 愛知医科大学・消化器内科

伊藤清顕 愛知医科大学・消化器内科

研究要旨：本研究は、B型肝炎ウイルス(HBV)の感染過程における糖鎖の役割を解明し、他研究課題と連携しB型肝炎の新規治療薬の開発を目指す。B型肝炎の治療にはインターフェロンや核酸アナログ製剤が用いられているが治療効果が不十分で根治することが出来ない。一方、創薬のターゲットとしてHBVの感染や複製の過程が研究され、糖鎖の関与が示唆されている。しかし、糖鎖の機能解析をより生体内に近い条件で研究する事は難しく、新しい糖鎖解析技術を用いて網羅的に解析する事が必須である。本研究では、肝疾患やHBV作製・感染実験の専門家とグライコプロテオミクス技術など最先端の糖鎖機能解析技術を開発・実用化してきた糖鎖生物学者との協力体制により、HBV感染における糖鎖の機能を理解し、HBVに対する創薬実用化を図る。1) HBV (HBs抗原)の糖鎖解析：多数の検体から種々のGenotypeのHBV (HBs抗原)を調製し、自ら開発したレクチンアレイ技術を応用し、糖鎖解析を行う。2) HBV感染可能細胞の糖鎖解析：産総研独自のグライコプロテオミクス技術を用いHBV感染可能細胞と非感染可能細胞の糖鎖プロファイリングを行う。3) HBV-宿主細胞における糖鎖の役割：HBVの感染機構を明らかにするために、新たにHBs抗原アレイを作製し、肝細胞結合に関わる分子を探索する。4) 糖鎖変異のHBVの増殖・感染能への影響：HBVを産生する肝細胞の糖鎖合成系を阻害し、HBV粒子の形成・分泌能を比較する。また、分泌されたHBVの感染能を解析する事により、HBV上の糖鎖の機能を明らかにし、創薬開発のためのターゲットとする糖鎖を明らかにする。5) 糖鎖修飾を受けたHBs抗原の大量精製：ヒト型糖鎖を発現する酵母を用い、HBs抗原の大量精製を行う。現在ワクチン用に使用されている通常の酵母由来のHBs抗原と比較し、より有効なワクチンの開発に繋げる。1-3年次は、糖鎖構造解析とグライコプロテオミクス技術により、HBVの感染過程における糖鎖の機能を明らかにし、医用応用のための基盤研究を行う。4-5年次は解析した肝細胞側の糖鎖および糖鎖合成系の役割をもとに、他研究グループと連携し、B型肝炎を治療する新規治療薬の開発やワクチンの実用化へ繋げる。

A. 研究目的

HBVの感染過程における糖鎖の機能を明らかにし、HBVの感染を阻害する薬剤のシーズを

探索する。HBVの糖鎖構造を解析し、ウイルス粒子の形成や分泌に関わる糖鎖構造を同定し、抗HBVの創薬のターゲットとする。



我々はこれまでに HBV のエンベロープ蛋白上の 146 番目のアスパラギンへの N 結合型糖鎖が HBV の細胞外への放出に必須であることを報告してきた (Ito K, et al. J Virol. 2010)。この 146 番目のアスパラギンを異なるアミノ酸に変異させると HBV 粒子が細胞外に全く分泌されなくなるため、蛋白自体の folding 不良による粒子形成不全もしくは小胞体からゴルジ装置への細胞内輸送不全により HBV の分泌が阻害されるものと考えられる。これに対して、本研究の第一段階のステップとして、各種糖鎖プロセッシング阻害剤を用いることにより、どの過程の糖転移酵素が分泌に重要か、また分泌がどの程度ブロックされるかに関して実験を行った。次のステップとしては糖鎖合成系に関連する糖鎖遺伝子を阻害する各種 siRNA を用いて、細胞内の糖鎖合成系の各機能を阻害することにより、HBV の複製から分泌にかけて重要なファクターを模索し、新たな阻害剤開発に向けた情報を得た。

## B. 研究方法

これまでの *in vitro* 実験では、transfection 試薬を用いた transient の系で各種糖プロセッシング阻害剤の HBV 複製および分泌に対する影響を解析してきた。しかし、これまでのデータをもとに解析を行うと、試薬を用いた transfection 効率に各 well 間で差があり、次の siRNA を用いた実験系では測定誤差の原因となると考えられた。このため、siRNA を用いた糖鎖合成系を標的とした HBV 複製および分泌に関するスクリーニングでは、HBV DNA が細胞に組み込まれている HBV 持続産生系 HepG2.2.15 細胞を用いて実験を行った。産業技術総合研究所糖鎖医工学センターより提供された siRNA 固相化済み 12 well plate を用いて、それぞれの糖鎖遺伝子に対する siRNA の HBV に対する影響を観察した。本プレートは各 well

にそれぞれの標的とする糖鎖遺伝子に対して、3 種類の siRNA の mixture が固相化されている。各 well 間で等量の HepG2.2.15 細胞を専用の培養液を用いて培養し、翌日に培養液を洗浄、新しい培養液と交換した。その後 4 日目に培養液および細胞を harvest した。Harvest した培養上清を用いた HBsAg は ELISA 法により、HBV DNA は real-time PCR 法により定量を行った。

## C. 研究結果

86 種類の糖鎖遺伝子を標的とした siRNA による一次スクリーニングの結果、分泌される HBV に対して 60%以上の阻害が認められた siRNA を 5 種類、40%~60%の阻害が認められた siRNA を 11 種類認めた。これらの siRNA を二次スクリーニングの対象とした。また、逆に HBV の分泌が 200~300%と増加した siRNA を 2 種類、300%以上の増加が認められた siRNA を 2 種類認めた。これらの増加した siRNA に関しても、HBV を何らかの形で阻害していた物質を抑制した可能性があり、創薬シーズにつながる可能性が残るため、二次スクリーニングの対象とした。

## D. 考察および結論

糖プロセッシング阻害剤による HBV に対する抑制効果は、エンベロープ蛋白とコア粒子との assembly の障害、もしくは粒子の細胞内輸送での障害によると考えられた。糖プロセッシング阻害剤による HBV の抑制効果は比較的弱く、抗ウイルス剤として使用することは難しいと推察された。しかし、糖鎖遺伝子を標的とした siRNA が HBV を抑制することが明らかとなり、HBV に対して糖鎖合成系をターゲットとした創薬の可能性が示唆された。糖鎖合成系を標的とした HBV に対する抗ウイルス剤としての創薬シーズの発見が可能であり、今後の創薬研究に貢献できる可能性が示唆された。

E. 研究発表（本研究に関わるもの）

1. 論文発表

- 1) Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology* 59 (1): 89-97. 2014

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響・II

安形清彦 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター  
梅谷内晶 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター  
佐藤 隆 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター

研究要旨：日本人の約1%に相当するB型肝炎患者の治療に、インターフェロンや核酸アナログ製剤が用いられているが、根治することが難しく新規創薬が望まれている。本研究班では、B型肝炎ウイルス(HBV)の感染や複製における糖鎖の役割を明らかにし、B型肝炎の新規治療薬の開発を目指す事を目的としている。そこで本研究課題では、糖鎖遺伝子ライブラリーを保持し糖鎖機能解析技術を開発・実用化して来た糖鎖生物学者と肝疾患やHBV作製・感染実験の専門家との協力体制により、糖鎖改変のHBVの増殖・感染能への影響を解析し、HBVに対する創薬ターゲットを探求する。まず、qRT-PCRアレイや次世代シーケンサーを用いHBVを作製する肝癌細胞と肝細胞の糖鎖遺伝子発現を解析し（梅谷内らの課題を参照）、糖鎖改変細胞を作製するためのcDNAプレートやsiRNAプレートを作製した。次にタグ付きのHBs抗原を構築し肝癌細胞で発現させ、細胞培養液中に分泌されるHBs抗原上の糖鎖の有無を解析する系を開発した。ウイルス粒子形成・分泌や感染への糖鎖の影響を調べるために、糖鎖合成の阻害剤を用い、糖鎖が付いたHBs抗原の発現やHBVの分泌に差が出る事を確認した。さらにsiRNAライブラリーを用いて糖鎖改変細胞を作製しスクリーニングを行った結果、86siRNAターゲットのうち15糖鎖遺伝子でHBs抗原の糖鎖が減少した。HBVを産生する肝細胞の糖鎖合成系を改変することによって、HBV粒子の形成・分泌能を抑制する創薬ターゲットとなる可能性を見いだした。

A. 研究目的

日本には約110-140万人のB型肝炎ウイルス(HBV)保有者がいると考えられ、従来型の母子感染に加え水平感染によっても広がりつつある。HBV感染患者の約10%が慢性肝炎や肝硬変、さらにその内の数%の方が肝細胞癌を発症するとされ、長期にわたる治療と経過観測が必要となっている。現在HBVの治療法として、核酸アナログ剤の継続投与が実施されているが、HBV DNA中の変異による薬剤耐性ウイルスの

出現が問題になっている。また、B型肝炎においてはインターフェロンによる治療成績が悪い場合が多く、特にgenotype間での治療効果に差がある事が報告されている。日本ではHBVワクチンはユニバーサルワクチンではないために、今後も輸血・移植における感染事故や水平感染を防ぐ事は難しい。従って、HBVの感染/複製機構のより詳細な理解を進め、逆転写酵素に代わる新規の創薬ターゲットを開発する事が重要である。

これまでに HBV においては HBs 抗原上に糖鎖が付加されている事が知られているが、機能についてはあまり研究が進んでいない。伊藤らの報告によれば、糖鎖付加が感染性を有する HBV の粒子形成や分泌に重要である事が示唆されており、糖鎖付加を制御する事により HBV の放出を阻害する事が考えられる。本研究では、HBV 作製細胞の糖鎖合成系を阻害する事により、ウイルス粒子の形成や分泌に関わる糖鎖構造を同定し、抗 HBV の創薬のターゲットを探索する。

## B. 研究方法

本研究では、HBV 感染における糖鎖の機能を解析し、HBV に対する創薬ターゲット分子を探索するために、HBs 抗原上の糖鎖の有無を解析する系の開発、糖鎖改変細胞の作製、siRNA ライブラリーなどを用いてスクリーニングを進めた。

### (1) HBs 抗原 cDNA ライブラリー用発現ベクター：

HBV のエンベロープタンパク質である HBs 抗原 (S-HBs, M-HBs, L-HBs) cDNA (genotype C, 名古屋市立大学より供与頂いた) を PCR で増幅しサブクローニングした。分泌シグナルとタグを導入し、HBs 抗原発現ベクターを構築した。塩基配列を決定し確認した後に、プラスミド DNA をエンドトキシムフリーで調製した。HuH7 細胞を調製したプラスミド DNA で形質転換後に抗体ビーズで回収し、SDS-PAGE とウエスタンブロッティングを行い HBs 抗原の発現を確認した。

### (2) 糖鎖合成阻害剤の HBs 抗原粒子形成・分泌への影響：

N 型・および O 型・糖鎖の合成阻害剤約 10 種を購入した。HuH7 細胞に S-HBs 抗原の発現ベクターを導入し、24 時間後にツニカマイシンな

どの糖鎖合成阻害剤を含む培地と交換した。48 時間後に培養上清から S-HBs 抗原を抗体ビーズで回収し、上述の様に S-HBs 抗原の発現を検出した。

### (3) 糖鎖遺伝子の発現解析：

肝細胞の一次培養、HuH7 細胞や HepG2 細胞などの肝がん細胞から total RNA を調製し、cDNA を合成した後に糖鎖遺伝子の発現量を qRT-PCR 解析 (糖鎖遺伝子 qPCR アレイシステム) や whole transcriptome 解析 (次世代シーケンサー) を実施した。この結果を基に糖鎖遺伝子をその発現パターンで 2 群 (抑制目的と過剰発現目的) に分け、それぞれ cDNA ライブラリーと siRNA ライブラリーの作成を進めた。

### (4) ライブラリーの調整：

昨年同様に cDNA ライブラリー用発現ベクター (共通の Kozak 配列を開始コドン前に C'末に Flag タグ) をもちいて、糖鎖遺伝子 cDNA をクローニングした。cDNA ライブラリーは産総研で集積された糖鎖遺伝子ライブラリーを基に PCR で増幅した。各クローンは塩基配列を決定し選別した後に、プラスミド DNA をエンドトキシムフリーで調製した。タグを付加する事によって、形質転換後に共通のタグを用いて各糖鎖遺伝子の発現量を比較出来る様にした。

HuH7 細胞を調製したプラスミド DNA で形質転換後に回収し、SDS-PAGE とウエスタンブロッティングを行い糖転移酵素の発現を確認した。siRNA ライブラリーの作製は 86 個の糖鎖遺伝子にそれぞれ 3 種類の siRNA を合成した。遺伝子発現の定量は遺伝子特異的なプライマーを作製し、qRT-PCR によって測定した。

### (5) スクリーニング：

1 つの遺伝子につき 3 種の siRNA を等量ずつ混ぜ、12-well プレートに固定した。形質転換前

に試薬と混ぜ、HuH7細胞をトリプシン処理し細胞を調製し、リバーストランスフェクションを行った。24時間後にS-HBs抗原の発現ベクターを導入し、48時間後に上述の様にS-HBs抗原を回収し、ウエスタンブロットングによりS-HBs抗原の発現と糖鎖の有無を検出した。

### C. 研究結果

(1) HBV表面上の糖鎖はHBs抗原への糖鎖修飾であり、糖鎖合成系のHBs抗原の形成・分泌への影響を調べるために、まずリコンビナントHBs抗原の高発現系と精製法の検討を行った(館野・佐藤らの課題を参照)。genotype CのHBs抗原cDNAから作製したHBs抗原発現ベクター(S-HBs, M-HBs, L-HBs)をHuH7細胞にトランスフェクションして、48時間後にサンプルを回収した。培養上清を回収し、PBSで洗浄後に細胞を溶解し遠心後にライセートを得て、抗体ビーズを用いてリコンビナントHBs抗原を回収した。

細胞ライセートから回収したリコンビナントHBs抗原をSDS-PAGEで展開し、抗FLAG抗体でウエスタンブロットした結果、S-HBs, M-HBsそしてL-HBsそれぞれ糖鎖有無の2本のバンドが検出された(図1)。培養上清から回収したリコンビナントHBs抗原の場合、S-HBsとM-HBsのみが検出され、L-HBsが検出されないことからタグを付加したN'末側が切断されていると考えられる。興味深い事に、N型糖鎖有無の割合はほぼ1:1に維持されていた。

(2) 糖鎖合成に関わる遺伝子(糖転移酵素やグリコシダーゼ)は主に小胞体とゴルジ体に局在している(図2)。12-well, 24-well及び48-wellのプレートにHuH7細胞を播種し、S-HBs抗原の発現ベクターを導入24時間後に糖鎖合成阻害剤を含む培地と交換し、48時間後に培養上清から抗体ビーズで回収した。S-HBs抗原の発

現は抗FLAG抗体を用いて検出した(図3)。一部の糖鎖合成阻害剤によってS-HBs抗原の分泌が有意に減少する事が確認された。

(3) HBV上の糖鎖はHBs抗原の糖鎖であり、宿主肝細胞の糖鎖合成系を用いて行われる。糖鎖修飾のHBV粒子形成や分泌への影響を効率良く解析するために、HBVやHBs抗原を発現させる細胞の糖鎖遺伝子の発現を解析した。

HBVを作製するHuH7細胞やHepG2細胞の糖鎖遺伝子の発現量を解析するために、qRT-PCR(糖鎖遺伝子qPCRアレイシステム)による糖鎖遺伝子発現解析の結果、約190種類の糖鎖遺伝子の発現プロファイルを得た。肝細胞の糖鎖遺伝子発現とも比較し、糖鎖遺伝子群を高発現と低発現(発現無しを含む)の2群に分けた。

同様にtotal RNAよりcDNAを合成後に次世代シーケンサーを用いwhole transcriptome解析を行った。基本的にqPCRアレイシステムと同様な結果が得られたが、whole transcriptome解析からは課題3にも繋がるような糖転移酵素以外の情報が得られた。

(詳しくは梶谷内らの課題を参照。)

(4) 上述の糖鎖遺伝子qRT-PCRアレイの結果を基に、糖鎖遺伝子とその発現レベルで2群(過剰発現目的と抑制目的)に分け、それぞれcDNAライブラリー(約100遺伝子)とsiRNAライブラリー(約80遺伝子x3本)の作製を進め、糖鎖改変細胞群を調製した。

昨年度の報告に引き続きcDNAライブラリー作製を行いほぼ終了した。糖転移酵素の発現量を確認するためには形質転換後に細胞を回収し、SDS-PAGEで分離後にウエスタンブロットングを行い、クローニングされた糖鎖遺伝子がHuH7細胞で発現することを確認した。

siRNAライブラリーによる糖鎖遺伝子のノック

クダウンは一部の糖鎖遺伝子については qRT-PCR によって確認した。HuH7 細胞あるいは HepG2 細胞を siRNA で形質転換後に RNA を調製し、qRT-PCR によって確認した。調べた限り、おおむね 70-90% 発現量を低下させることに成功しているが、50% 前後の物も見られ、効果に差がある siRNA も認められた。

(4) 糖鎖修飾の HBV 粒子形成や分泌への影響を解析するための 1 つとして、投資電子の改変細胞を作製した。上述の様に siRNA は比較的用意にプレート上の殆どの細胞を形質転換可能である。まずリバーストランスフェクションにより

3 種の siRNA/well を HuH7 細胞に導入し、24 時間後に S-HBs 抗原の発現ベクターで形質転換し、S-HBs 抗原の発現を解析した (図 4)。

86 糖鎖遺伝子に対するスクリーニングを行った所、10 種以上の遺伝子について、コントロール siRNA と比較して、S-HBs 抗原の発現が低下した物あるいは糖鎖の付加が減少したものが確認された (図 5)。これらの実験と並行して、HBV 産生細胞である HepG2.2.15 細胞を用いて HBV 粒子の分泌への影響を解析した (伊藤と米田の課題を参照)。

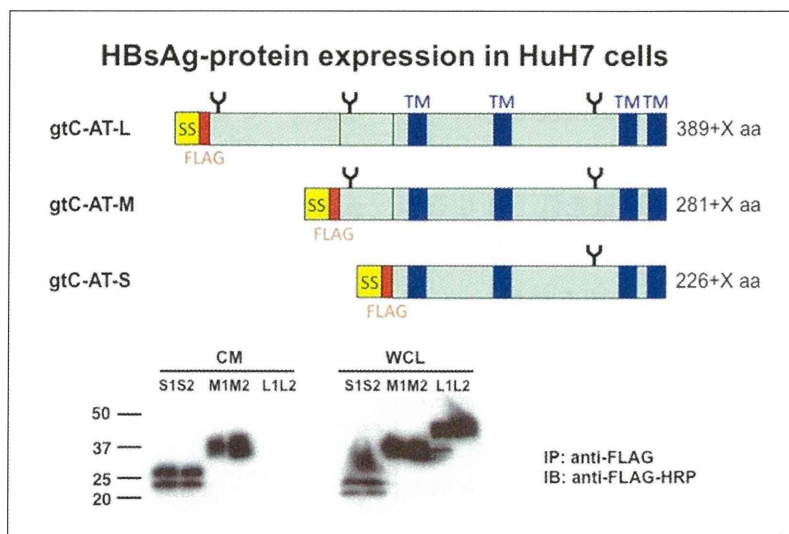


図1 HBs 抗原 cDNA 発現ベクター の構築 HBs 抗原 (S-HBs, M-HBs, L-HBs) cDNA (genotype C) に、分泌シグナルと FLAG タグを導入し、HBs 抗原発現ベクターを構築した。4つの膜貫通領域 (TM) が想定されており、N型糖鎖付加部位も3カ所示唆されている。(下段) HuH7 細胞で発現させた結果、L-HBs は細胞ライセート (WCL) でのみ確認され、培養上清 (CM) では検出されなかった。

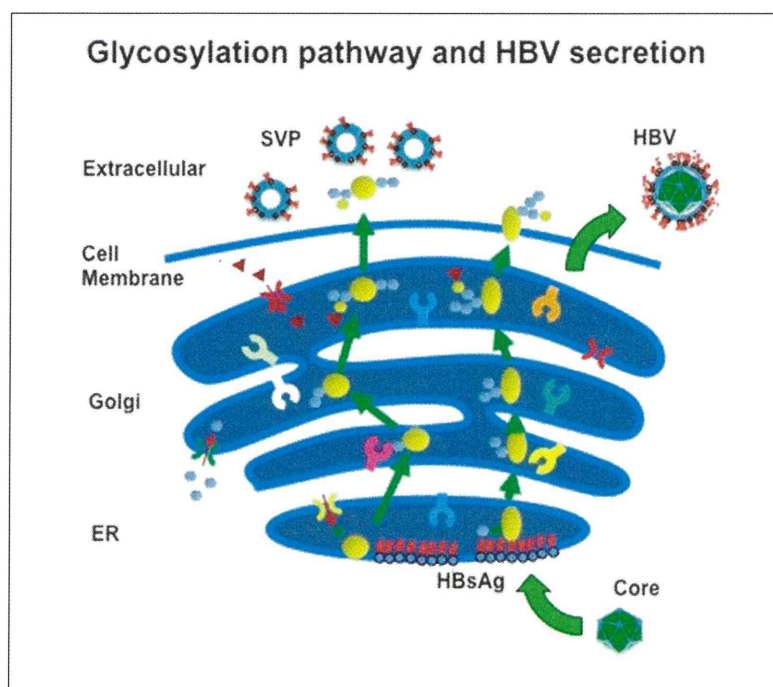


図2 糖鎖修飾経路と HBV 分泌 糖鎖合成に関わる遺伝子は主に小胞体 (ER) とゴルジ体 (Golgi) に局在している。小胞体で HBs 抗原にコアが内包された場合、感染性を有する HBV となる。一方コアを含まない HBs 抗原はウイルス様粒子 (SVP) となる。ともにゴルジ体を通ずる際に糖鎖修飾を受けると考えられている。HBV と SVP が同一の経路をたどるかは分かっていない。

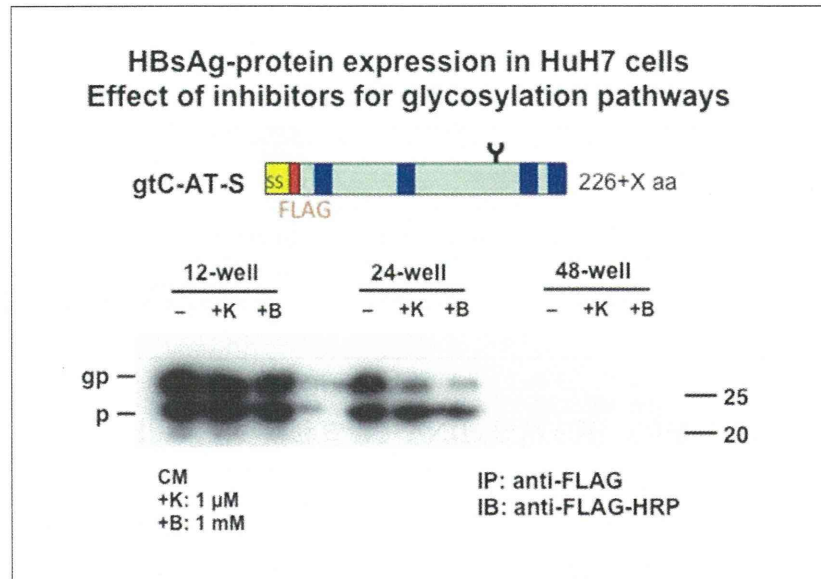


図3 糖鎖合成阻害剤の HBs 抗原粒子形成・分泌への影響 S-HBs を HuH7 細胞で発現させると糖鎖有り (gp) と糖鎖の付いていない (p) HBs 抗原の 2 種の (糖) タンパク質が検出される。糖鎖合成阻害剤(K, B)を添加した場合、HBs 抗原上の糖鎖修飾が抑制され HBs 抗原の分泌量が減少した。

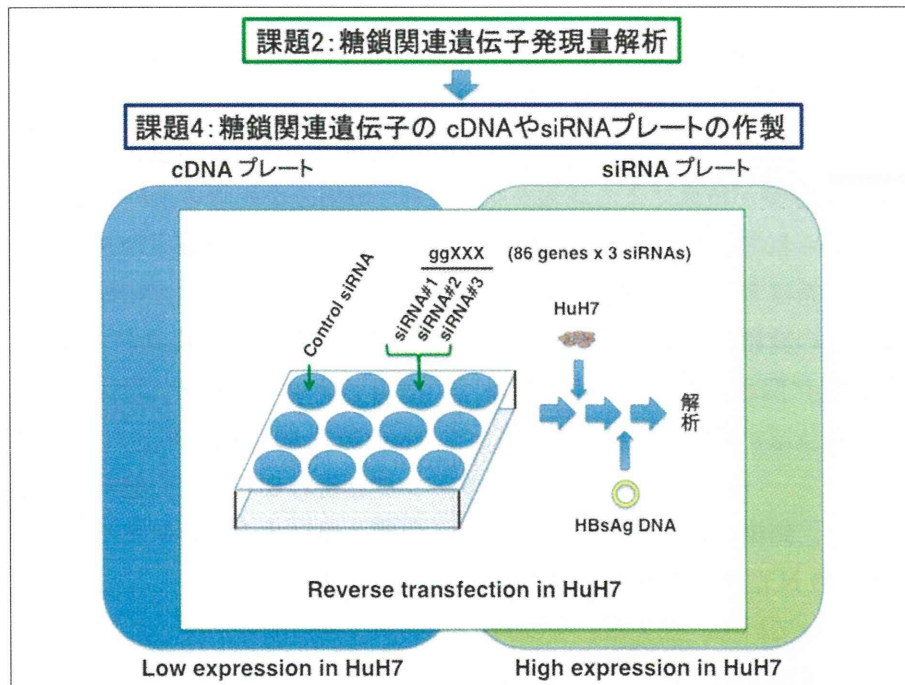


図4 糖鎖改変細胞による HBs 抗原形成・分泌への影響 課題2で糖鎖遺伝子の発現量を解析し、肝細胞における糖鎖遺伝子群を高発現と低発現(発現無しを含む)の2群に分けた。本課題では、高発現している糖鎖遺伝子に対し siRNA プレートを作製し、低発現している遺伝子には cDNA プレートを作製した。siRNA プレートでは3つの siRNA を well に固定し、HuH7 細胞を形質転換、HBs 抗原 cDNA で形質転換、そして上清より HBs 抗原を回収して解析に用いた。





図5 siRNA プレートの実験例 HBs 抗原 cDNA で形質転換後に、HuH7 細胞の培養上清より回収した HBs 抗原は糖鎖有り無しの2種の(糖)タンパク質が検出される。同様にコントロール siRNA でも糖鎖有り無しの2種のバンドが1:1で検出される。siRNA の添加により HBs 抗原の発現に差が見られた。例えば、8番の siRNA では、糖鎖を有する HBs 抗原の減少が顕著である。

#### D. 考察

本研究では糖鎖から見た HBV 感染における創薬ターゲットを選定することを目的としている。これまでの研究から、1) HBV 感染に関わる肝細胞表面の糖鎖及び糖鎖関連分子(受容体とコファクター)、2) HBs 抗原上の糖鎖が感染性のある HBV の形成・分泌に関与している可能性、3) HBs 抗原上の糖鎖が抗体による認識を阻害する可能性が考えられている。すなわち宿主肝細胞側の糖鎖合成系は HBV の糖鎖修飾も担うので、宿主肝細胞の糖鎖合成系を阻害することにより、HBV 感染に関わるこれらの糖鎖や糖鎖関連分子に影響を及ぼす事が出来ると考えられる。

最近の研究により、感染能の有る HBV の分泌には HBs 抗原上の N 型糖鎖の付加が必要である事が明らかになっている。例えば、ツニカマイシンやノジリマイシンなどの N 型糖鎖の合成阻害では、HBV DNA を含まないウイルス様粒子が放出されるものの、感染能を有する HBV 粒子は分泌されないことが報告されている(伊藤ら、2010)。我々の実験結果でも、幾つかの糖鎖合成阻害剤が有意に S-HBs 抗原の発現を抑制する事が示されており、糖鎖の重要性が確

認された。肝細胞の活動に影響を及ぼさない濃度の決定などが難しいが、感染細胞だけを選択的に処置するなどの技術開発とともに検討する必要がある。

今回調製した糖鎖遺伝子の cDNA ライブラリーや siRNA ライブラリーは200種以上有る糖鎖遺伝子の90%以上をカバーしており、現在、糖鎖改変細胞を用い、HBV の分泌や感染にどのような影響を及ぼすかをスクリーニングしている。既に10種以上の糖鎖遺伝子 siRNA が S-HBs 抗原の発現を抑制する事を確認しており、同時に愛知医科大学で検討している HepG2.2.15 細胞を用いた siRNA のスクリーニングと合わせて、どの糖鎖遺伝子が重要なのかを明らかにする必要がある(米田・伊東の分担報告書を参照)。

#### E. 結論

これまで HBV 感染・複製における糖鎖の役割は殆ど解析されておらず、当研究班では HBV あるいは宿主肝細胞の糖鎖及び糖鎖関連分子をターゲットとした創薬の可能性を研究している。

本研究課題では、まず糖鎖合成阻害剤の効果を S-HBs 抗原の形成・分泌で確認した所、幾つ

かの阻害剤が有意に S-HBs 抗原の発現を抑制する事を見出した。そこで糖転移酵素の発現解析結果を基に、過剰発現用に約 100 種の cDNA、抑制用に約 80 x 3 種の siRNA ライブラリーを用意し、肝細胞あるいは肝がん細胞で糖鎖改変細胞作製を可能にした。cDNA の発現、siRNA によるノックダウンも調べた限りでは、期待通りの結果が得られた。次に siRNA ライブラリーをスクリーニングした所、10 種以上の糖鎖遺伝子 siRNA が S-HBs 抗原の発現を抑制する事を確認した。2 次スクリーニングでさらに有効な siRNA の特定を行い、創薬ターゲット候補の同定を進める予定である。

以上のように、HBV の感染過程（粒子形成・分泌）における糖鎖合成の重要性と糖鎖機能解析を中心に医用応用のための基盤研究を行い、さらに B 型肝炎を治療する新規治療薬の開発へ展開していきたい。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

(15) **Angata K, Ito K, Togayachi A, Sato T, Ito H, Ocho M, Yoneda M, Narimatsu H.**  
Glycosylation of HBsAg and its role in secretion pathway. TASL-Japan Hepatitis B Workshop. 2014/04/19-20. Taipei

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

B型肝炎ウイルスにおける糖鎖の機能解析と医用応用技術の実用化へ

千葉靖典 産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門

A. 研究目的

B型肝炎はC型肝炎と比較して治療成績が低く、画期的な新規治療薬の開発が望まれている。国民のニーズの高いB型肝炎の画期的な新規治療薬の開発等を目指し、基盤技術の開発を含む創薬研究や、治療薬としての実用化に向けた臨床研究等を総合的に推進するためには、治療用も含め新たなワクチン開発が重要である。

我が国で使用されている主なHBVワクチン（HBs抗原）は酵母由来である。その製品としてはヘプタバックス（Merck社、GenotypeAを認識）、ビームゲン（化血研、GenotypeCを認識）があげられる。これらはHBs抗原のS領域を酵母で発現させており、糖鎖は付加されていない。近年、これらのワクチンを接種したにも関わらず、B型肝炎に罹患する例が増えてきている。その原因としてはHBVエスケープミュータントの発生の可能性もあるが、免疫源としたHBs抗原のS領域に対してできた抗体が、感染したB型肝炎ウイルスを十分に認識していない可能性が指摘されている。実際に免疫してできた抗体のエピトープ解析の結果では、糖鎖が付加されるS領域のループ構造に対して抗体ができています。このことは、糖鎖を持ったB型肝炎ウイルスでは立体障害により抗体が結合できない可能性がある事を示唆している。従って、より天然に近いHBs抗原をワクチンとして利用する事により有効性が高くなる可能性がある。

研究分担者の千葉は、これまでに酵母によるタンパク質発現に関する研究を行ってきた。さらにヒトと同じ形の糖鎖を付加できる「ヒト型糖鎖含有タンパク質生産酵母」（天野、千葉、成

松ら PNAS 2008）を保有しており、これらの技術とツールを活用し、より効果の高いHBVワクチンの開発を検討する事を目的とする。

B. 研究方法

(1) HBs抗原の発現

出芽酵母にHBs抗原の遺伝子を導入したクローンを前培養後、5Lの1xカザミノ酸-Ura培地（0.67%酵母ニトロゲンベースw/oアミノ酸、1%カザミノ酸、2%グルコース、40 μg/mlトリプトファン、40 μg/mlアデニン1/2硫酸塩）に植菌し、30℃、120時間培養を行なった。遠心により菌体を分離後、その上清の一部をSDS-PAGEに供し、PVDF膜に転写後、ウエスタンブロット解析により発現の確認を行なった。一次抗体としては市販の抗HBs抗体（抗PreS1モノクローナル抗体（マウス）；特殊免疫研究所、またはHepatitis B surface Antigen A, Goat Antibody; PROSPEC）を用い、二次抗体は抗マウスIgG抗体・ペルオキシダーゼ、または抗ヤギIg抗体・ペルオキシダーゼを使用した。検出はECL Western Blotting Detection Reagents（GE）を用いイメージアナライザー（GE LAS-1000）で行なった。

(2) HBs抗原の精製

HBs抗原の精製については、従来報告のあるButyl-Sカラム、DEAEカラム、ゲルろ過カラム（GE）などを用いて検討した。また前処理の方法として、塩溶、尿素やグアニジン塩酸による変性と透析による精製、フィルター（Millipore）処理などを検討した。

### (3) 倫理面への配慮

本課題は産総研の組換え DNA 実験委員会の承認を得ている。本分担課題では、患者さんの遺伝子情報、細胞等は取り扱わない。また本年度実験動物は取り扱わないことから、倫理面の問題は無いと判断した。

### C. 研究結果

昨年度までに、4種類の HBs 抗原をコードする遺伝子を全合成し、酵母のプラスミドベクターに挿入し、野生型酵母の形質転換を行なった。現在上市されている B 型肝炎ワクチンは、HBs 抗原の S 領域を酵母細胞内で発現している。これまでワクチンとして L 領域を発現させた例があまりないことから、pre-S1、pre-S2 を含む全長を発現させた。さらに糖鎖構造がより天然に近いワクチンの方がエスケープミュータントの抑制に効果があると考えられたため、糖鎖付加が起こるようにシグナルを付加して、分泌経路を通過させて培地中に分泌させるようにした。その結果、Genotype A 1 種類、Genotype C 1 種類の HBs 抗原を糖鎖が付加された形で発現させることに成功した。この培養上清に発現した HBs 抗原は抗 pre-S1 抗体でも検出されたことから、L 領域の N 末端を含む形で発現していることが確認された。

今年度は、まず酵母の培養上清からの HBs 抗原の精製を検討した。培地の条件検討を行ったところ、YPAD 培地や 2x カザミノ酸培地に比較し、比較的低栄養源である 1x カザミノ酸培地が適していると考えられた。一方、過去に報告のあったスクロースと無機塩を含む合成培地では生産が確認されなかった。次に 1x カザミノ酸培地で HBsAg 発現酵母を培養し、培養上清を透析した後、硫酸塩析の条件検討を行った。10% 飽和硫酸の条件でも HBsAg は沈殿してくることが判明したため、培養上清に 10% 飽和となるように硫酸を添加し、遠心により得られた沈殿

を 10 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) に溶解して -20°C で保存することとした。以後はこの溶液から適宜 HBsAg を精製することとした。

次に培養時間の検討を行った。24 時間毎、120 時間まで培養を行ない、経時的にサンプリングして、ウエスタンブロット解析を行なった。その結果、120 時間まで発現が増加し、またポリクローナル抗体を用いた分析でも分解も見られなかったことから、120 時間培養を行なうこととした。また 15000 rpm で遠心を行なうと HBsAg は沈殿することから、微粒子またはタンパク質複合体として存在していることが示唆された。そこで、遠心機の回転数を変化させて沈殿する条件を検討したところ、3000 rpm でも沈殿することがわかった。この HBsAg を含む沈殿物は sonication では可溶化しないことが示されたため、尿素やグアニジン塩酸を用いていったん変性させ、その後徐々に透析することで HBsAg を回収することを検討した。その結果、8 M 尿素、6 M グアニジン塩酸で処理することにより HBsAg は可溶化することがわかった。一方、0.5 M NaCl では可溶化されなかった。このサンプルを透析後、0.45  $\mu$ m のフィルター処理を行なったが、HBsAg はフィルターを通過することが確認された。以上の結果から、培養上清を遠心後、8 M 尿素による変性、透析、フィルター処理という、HBsAg をカラム精製するための前処理法を確立した。また SDS-PAGE 後の染色は CBB により行なっていたが、より感度よく検出するため、Oriole Gel 染色法を用いることとし、その染色条件を確定した。

前処理したサンプルをまず陰イオン交換カラムである Hitrap DEAE に供し、NaCl によるグラジエントにより HBsAg を溶出した。ウエスタンブロットの結果から、HBsAg は 0.2 - 0.45 M NaCl 溶出画分に溶出されていることが示唆された。しかしながら、Oriole 染色では多