

HBV感染可能細胞の糖鎖解析

梅谷内 晶	産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター
梶 裕之	産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター
伊藤 浩美	福島県立医科大学・医学部・生化学講座
安形 清彦	産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター
飯島 沙幸	名古屋市立大学大学院・医学研究科・病態医科学

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)の感染機構は受容体も含めて不明であり、現在の所HBVの持続感染系は構築されていない。宿主肝細胞側の糖鎖合成系はそのままHBVの糖鎖修飾を担うこともあり、肝細胞表面の糖鎖関連分子と共にHBVの感染に深く関与していると考えられる。本研究の目的は、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である。そこで本研究では、HBV感染可能細胞である肝細胞と感染出来ない肝癌細胞株との糖鎖合成系の違いまた細胞表面に発現する内在性レクチンなどの糖鎖関連分子の違いを明らかにすることを第一の課題としている。肝細胞株をグライコプロテオミクス解析・糖鎖構造解析し、さらに肝細胞株と初代肝細胞（肝臓）での糖鎖遺伝子発現についてqRT-PCRアレイ及び次世代シーケンサを用いて解析した。さらに得られたデータからバイオインフォマティクス技術により内在性レクチンの検索などを行った。また、ヒト肝臓化キメラマウスの肝細胞における糖鎖プロファイルの変化について解析を行った。

A. 研究目的

糖鎖はインフルエンザウイルスなど様々なウイルスの接着・侵入や粒子形成・分泌に関わっている事が示唆されている。現在日本には約150万人の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。同様に肝炎を起こすC型肝炎ウイルスでも糖鎖-レクチンを介した接着や侵入するシステムが示されている。ところが、HBVは持続感染系が構築されていないこともあり、肝細胞表面上の受容体は不明なままである。また、HBV感染における宿主肝細胞側の糖鎖の役割や感染後の糖鎖合成系の変化なども研究されていない。HBV上の糖鎖合成は

宿主である肝細胞が担っていることもあり、HBVの感染過程における宿主側肝細胞の糖鎖を解析することは、HBVワクチンや抗HBV薬を効率的に開発する上でも重要な課題である。

本研究では、糖鎖遺伝子解析技術・グライコプロテオミクス技術・レクチンアレイ技術などの糖鎖機能解析技術により、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。

B. 研究方法

HBV感染機構における肝細胞側の糖鎖の役割を明らかにするために、以下の解析を進めている。解析対象の試料としては、各種の肝臓細

胞株を始めに実施し、次いでヒト肝化マウス組織・細胞（±HBV感染）を対象とした、より詳細な糖鎖解析を進めていく。

- (1) 解析に必要な試料の準備と調製を行う。特に同一の試料にて各種解析を平行して行うために、肝細胞株、初代培養肝細胞なども大量に培養し、同一ロットによる試料を調製するなどした。
- (2) 産総研保有の糖鎖遺伝子定量システム（qRT-PCR アレイ）や次世代シーケンサを用いて、糖鎖遺伝子と、内在性レクチンを含む糖鎖関連遺伝子に特化して発現解析し、HBV感染に必要な糖鎖関連分子の発現とHBV感染に伴う宿主細胞の変化を解明する。今年度は肝細胞株での糖鎖遺伝子の発現を qPCR アレイにより解析するとともに、次世代シーケンサによる解析も行い、この両者の比較を行うなどした。
- (3) 産総研独自のグライコプロテオミクス技術、糖鎖構造解析技術により糖鎖プロファイリングを行う。具体的には、質量分析器（MS）による糖鎖構造解析およびレクチンアレイによる高感度糖鎖プロファイルを進め、宿主細胞の糖鎖発現を解析する。また、種々の試料でプロテオーム解析とグライコプロテオーム解析を行う。今年度は肝細胞株の糖鎖構造を MS により解析した。また、同細胞株における（グライコ）プロテオーム解析のデータを基にして、糖タンパク質あるいはレクチン様タンパク質の発現の調査を実施した。
- (4) HBV 感染と宿主肝細胞の糖鎖発現との関連について解析を行う。ヒト肝臓化キメラマウス（PXB マウス）より初代培養肝細胞を調製・培養し、これに患者血清由来の HBV を感染させ、その前後での糖鎖プロファイルの変化を解析した。また同様に、キメラマウス由来肝細胞を経時的（1 週～6 週まで）に培養し、宿主肝細胞の経時的な糖鎖糖鎖プロファイルの変化を解析した。

C. 研究結果

本研究における結果については以下の通りである。今後は詳細な遺伝子解析やヒト肝化マウスを使用した様々な条件下での解析を平行して進めていく予定である。

(項目 1) 肝臓細胞株、ならびにヒト肝化マウス組織・細胞を対象とした糖鎖遺伝子の発現解析、糖タンパク質の(グライコ)プロテオーム解析、糖鎖構造解析を行うための試料調製を進め、一部解析を行ってきた。始めに、ヒト肝臓細胞株である Huh7 細胞と HepG2 細胞などの試料を採取し、実験毎に適した調製を行った。また、市販のヒト肝臓細胞（初代培養）を培養し、同様の解析をするための試料調製を行った。

(項目 2) qRT-PCR（糖鎖遺伝子 qRT-PCR アレイシステム）による糖鎖遺伝子発現解析の結果、肝細胞株 2 種（HuH7 細胞、HepG2 細胞）における約 190 種類の糖鎖遺伝子の発現プロファイルを得た。それらの糖鎖遺伝子群を高発現（約 80 遺伝子）と低発現あるいは発現無し（約 100 遺伝子）の 2 群に分け、他課題（糖鎖改変の HBV の増殖・感染能への影響）の解析のための基礎情報とした。HepG2 および HuH7 の qRT-PCR アレイ解析の結果、感染可能である肝細胞と同様な発現レベルの遺伝子もあれば、異なる遺伝子もあり、糖鎖構造の結果同様細胞に依る差が明らかになった。

また、HepG2 および HuH7 の RNA とともに、市販のヒト肝臓由来 RNA あるいは培養したヒト肝臓細胞（初代培養）から抽出された RNA よりそれぞれ cDNA を合成し、これを用いて次世代シーケンサによる遺伝子発現解析を行った。糖鎖遺伝子と、内在性レクチンを含む糖鎖関連遺伝子に特化して発現解析した。糖鎖遺伝子の発現プロファイルの結果については、図 1 に示した。次世代シーケンサから得られる遺

伝子発現情報(例:全体で約400万Read、そのうち240万Readが約4.7万個の遺伝子にマップされる)は非常に膨大なため、そのデータをそのまま使用するのは非常に困難である。そこで、バイオインフォマティクス技術により、従来我々が構築してきた糖鎖遺伝子のデータベース(GGDB)などのデータを有効利用し、これらデータベースとの比較抽出などの作業によって糖鎖遺伝子のみを抽出・解析を行った。前述のデータとの比較なども行ったが、次世代シーケンサのデータと糖鎖遺伝子発現定量システム(リアルタイムqRT-PCR)のデータには基本的に相関性があると思われ、課題4に向けて抽出された糖鎖遺伝子プロファイルには問題無いことを確認した。また、内在性レクチンについては宿主細胞におけるHBV受容体として機能している可能性が考えられるため、同様に次世代シーケンサの遺伝子発現情報から、内在性レクチンの発現情報を抽出した。方法は糖鎖遺伝子の時とほぼ同様に、従来我々が構築してきた内在性レクチンのデータベースを有効利用し、これらデータベースとの比較抽出などの作業によって内在性のレクチン様ドメインを有するタンパク質(約240種類)のみを抽出し、解析を行った。ここから得られた発現情報は課題3へ利用された。

(項目3) 肝臓細胞株7種類について、膜画分や可溶性画分を用いたプロテオーム解析とグライコプロテオーム解析(IGOT解析)のデータを保有していたことから、これを用いて内在性レクチンの検索を行った。プロテオームのデータでは、平均して約2000~3000種類のタンパク質、グライコプロテオーム解析では平均して約600~850種類の糖ペプチドが登録されており、これを検索した結果、候補レクチン様タンパク質を見出し、これを他課題(HBV-宿主細胞における糖鎖の役割)の基礎情報とした。こ

れらの一部の試料については既に糖鎖遺伝子解析(qRT-PCR)および質量分析による糖鎖構造解析(N-結合型/O-結合型糖鎖解析)を行った。

[質量分析装置を用いた糖鎖構造解析]

現在までに実施した、質量分析装置を用いたHepG2細胞およびHuH7細胞、初代肝細胞、HBV粒子:SVP(subviral particles)の糖鎖構造解析については以下の通りである。

平成24年度は2種類の細胞株(HepG2とHuH-7)、平成25年度は肝細胞(hNHeps)およびHBV SVP試料について質量分析計を用いたN-結合型およびO-結合型糖鎖構造解析を行った。解析手順は以下の通りである。培養細胞(HepG2、HuH-7、hNHeps)については、それぞれ細胞ペレットから疎水性画分を抽出し、還元アルキル化・透析・トリプシン消化を、SVP試料については、還元アルキル化・エタノール沈殿・トリプシン消化を行ったのち糖鎖の切り出しを行った。N-結合型糖鎖についてはエンドペプチダーゼFにより酵素学的に、O-結合型糖鎖については還元脱離により化学的に処理し、N-とO-結合型糖鎖の遊離を行った。次に、N-ならびにO-結合型糖鎖は、MALDI測定の際のイオン化の感度および安定性を向上させるため、完全メチル化処理にてすべての水酸基ならびにカルボン酸をメチル化した(ただし、N-結合型糖鎖については酵素にて切り出された糖鎖を還元し、糖アルコールにしてから完全メチル化処理を行った)。得られたN-およびO-結合型糖鎖の完全メチル化体は、MALDI-多段階タンデム型質量分析計を用いてそれぞれの糖鎖構造についてシグナル強度にて比較解析を行い、それぞれの糖鎖構造解析結果については図2にまとめた。横軸は糖組成(Hexの数・HexNAcの数・Fucの数・NeuAcの数の順)で記載し、縦軸はそれぞれのMS結果で最も強度のある糖鎖シグナル強度を

100%とした相対強度で表示した。平成 24 年度に行った 2 種類の細胞株の結果では、N-結合型糖鎖については、両細胞間の糖鎖構造は類似しており、ほとんどがハイマンノース型であった。一方、O-結合型糖鎖については両細胞間で観測された糖鎖構造のほとんどがシアリル化糖鎖であったが、その相対量は図 2 (HepG2 : 赤と HuH-7 : 青) に示した通り異なる結果となった。平成 25 年度に行った 2 種類の試料(図 2 hNHeps : 緑と SVP : 紫)の結果では、hNHeps の N-結合型糖鎖については、HepG2 や HuH-7 と同じくほとんどがハイマンノース型であったのに対し、SVP ではほとんどがコンプレックス型という結果であった。HepG2 や HuH-7 では観測されなかった SVP のおもな糖鎖構造(図 2 上段の 5401 や 5402)について hNHeps では微量だが確認された。O-結合型糖鎖については、HepG2 や HuH-7 では糖鎖構造のバリエーションが 10 種類と多かったのに対し、hNHeps では 5 種類、SVP では 3 種類と構造のバリエーションは減っており、詳細な糖鎖構造についても HepG2 や HuH-7 に比べ hNHeps ではシアリル T 構造(図 2 下段の 1101)が主成分となっている点で SVP の構造に近い結果であった。

(項目 4) HBV 感染と宿主肝細胞の糖鎖発現との関連について解析を行った。ヒト肝臓化キメラマウス (PXB マウス) より初代培養肝細胞を調製した。具体的には非感染ヒト肝臓キメラマ

ウスの肝臓をコラゲナーゼ灌流して肝細胞を分離後に 10cm dish にまいた(1 枚につき約 1×10^7 cells)。これを Day0 とした。これらの細胞 (dish 一枚) に、患者血清由来の HBV (genotypeC) を感染させ、その後 12 日間の培養を行ったのちに回収した(図 3A)。陰性コントロールとしては HBV 非感染のものを同様に培養して、感染開始時と感染後 12 日目で回収した。それらの細胞を用いて膜糖タンパク質を抽出し(図 3B)、同量ずつレクチンアレイ解析に供した。HBV 感染前後での糖鎖プロファイルの変化を解析した結果(図 3C)、(1) 培養環境(経時的)の変化で糖鎖プロファイリングが変化した、及び(2) HBV 感染によって大部分のシグナルが増加傾向にあった、ことが明らかとなった。しかしながら、感染の前後の比較では幾つかのレクチンシグナルは増減が認められたが、これらに大幅な変動は見られなかった。そこで現在、キメラマウス由来肝細胞を経時的(1 週~6 週まで)に培養し、宿主肝細胞の経時的な糖鎖糖鎖プロファイルの変化を解析しているところである。2~3 週にかけて宿主細胞への感染能が大幅に落ちてくるということから、感染能の変動に伴う(経時的な)糖鎖発現のプロファイルの変化が認められるのかについて解析を進めている(感染・非感染での差も見られるか同様に解析する予定である)。

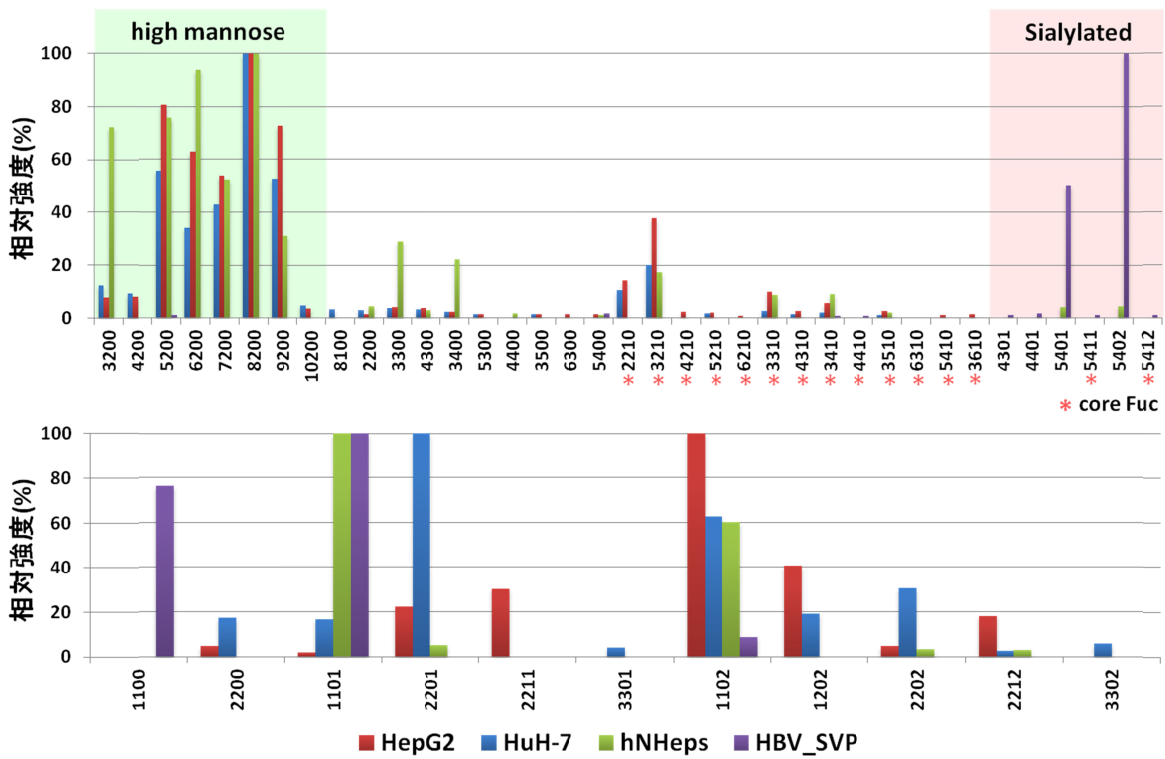


図 2

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）

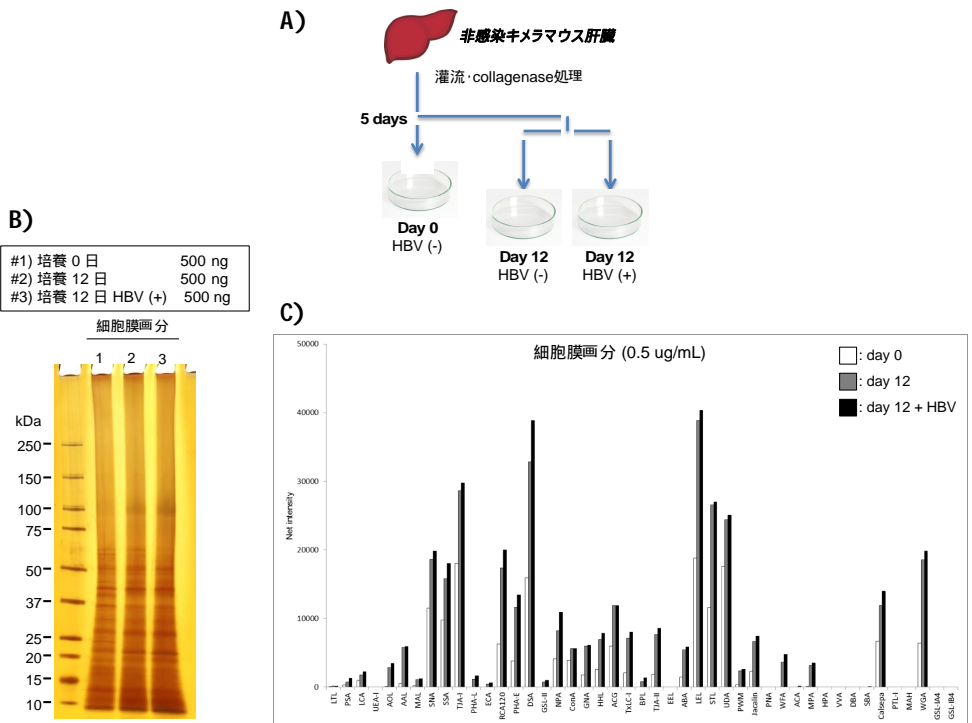


図 3

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