

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 粒子中ではそれぞれ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。

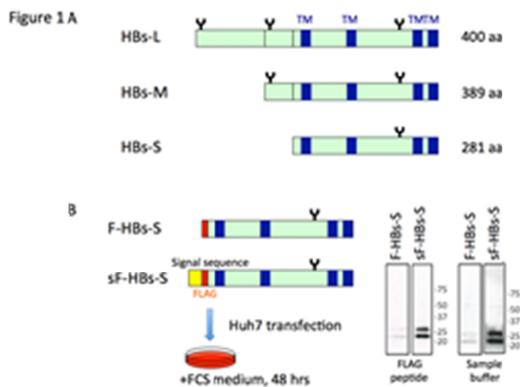
B. 研究方法

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

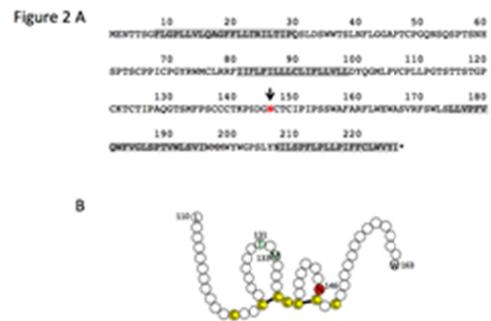
(1) **リコンビナント HBs-S の高効率発現**：最初に分子生物学的手法を用いて、リコンビナント HBsAg の高発現系の精製法の検討を行った。HBsAg を B 型肝炎ウイルス感染患者血清中や遺伝子工学的な手法で発現させた培養上清中より高収率に精製可能な抗体を検索したが、市販の抗体では精製は不可能であったことから、HBs-S の N 末端と C 末端に精製用の FLAG Tag を導入したリコンビナント HBs-S の発現を行った。テンプレート HBs-S DNA は名古屋

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(Invitrogen)に組換えた。作製し

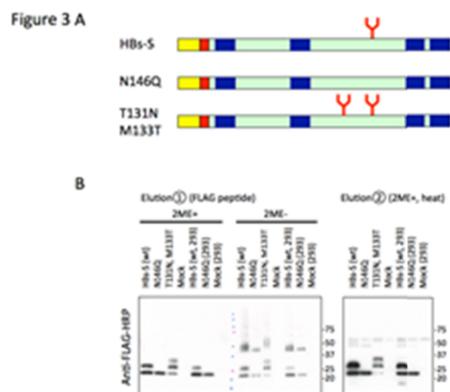


た発現ベクターを Huh7 細胞にトランスフェクションして、48 時間後に培養上清を回収し、抗 FLAG 抗体-agarose(Sigma-aldrich)を用いてリコンビナント HBs-S を吸着した。抗 FLAG 抗体からの溶出は 2 段階で行い、最初に FLAG ペプチドで競合溶出、その後、SDS-PAGE サンプルバッファを加え、100 加熱により溶出回収した。回収したリコンビナント HBs-S を SDS-PAGE で展開し、抗 FLAG 抗体でウエスタンブロットした結果、N 型糖鎖付きの gp28 と N 型糖鎖のない p25 の 2 本のバンドが検出された(Figure 1B, F-HBs-S)。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 型糖鎖付加部位変更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 箇所に増える変異も導入するために、T131 を N、133M を T に変更した 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



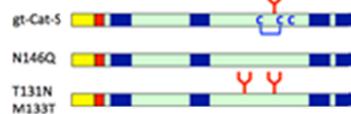
となった。続いて、T131N, M133T 変異体では、gp28 よりも大きな分子量の位置に新たなバンドが検出され、これは 2 本の N 型糖鎖が付加した HBs-S であると予想される。一方、変異を導入しない HBs-S で確認された N 型糖鎖付加体と糖鎖なしの 1:1 の割合は変化し、糖鎖なしの割合が大きく減少した(Figure 3B)。これらの結果は、T131N, M133T 変異により新たに導入した N 型糖鎖付加配列により、本来の HBs-S で確認された N 型糖鎖付加体と糖鎖なしの両方に新たな N 型糖鎖を付加させることができた可能性が考えられた。また、HBs-S はループ領域に 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：

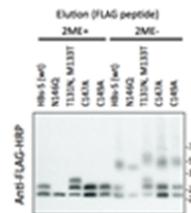
HBs-S のループ領域のシステイン残基は、124C-137C、139C-147C の 2 箇所分子内ジスルフィド結合を形成することが知られている(Figure 2B)。この中で 147C は N 型糖鎖付加部位 146N の直後に存在することから、小胞体におけるジスルフィド結合の形成とオリゴ糖転移酵素による N 型糖鎖前駆体付加が競合している可能性が考えられた。そこで C147 および C149 をアラニンへ変換した変異体を作製し、HBs-S の糖鎖付加への影響について検討した。もし、ジスルフィド結合と糖鎖付加が競合していれば、システイン残基を改変した C147A では、より効率的に糖鎖付加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

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



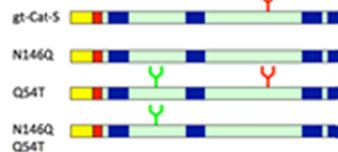
B



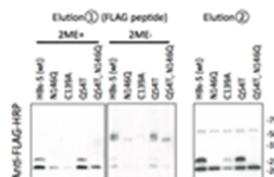
(4) 膜タンパク質配向性の糖鎖付加への影響：

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行われ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

- (1) **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