

厚生労働科学研究費補助金（**B型肝炎創薬実用化等研究事業**）
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究
分担研究報告書（平成 25 年度）

B型肝炎ウイルス蛋白質の抗インターフェロン活性および
ウイルス粒子形成における役割

研究分担者 坂口 剛正 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

研究要旨：B型肝炎ウイルス（広島YE株）の各蛋白質を培養細胞で発現させた。各蛋白質のインターフェロン・シグナル伝達に対する影響を検討したが、明瞭な特徴を明らかにできなかった。一方、P蛋白質（特に逆転写ドメイン）が全般的に蛋白質合成を抑制することを見いだした。また、いくつかのHBV蛋白質が単独発現で細胞から放出されることを見いだし、ウイルス粒子形成機構の解明に通じる成果を得た。

A. 研究目的

B型肝炎の治療戦略を検討するために、ウイルス蛋白質をプラスミドから発現する系を構築し、各蛋白質の性状を解析した。

インターフェロン（IFN）はウイルスに特異的に作用するサイトカインであり、ウイルスに対する自然免疫に重要な働きをしている。医薬品としてウイルス治療にも用いられているが、B型肝炎ウイルス（HBV）に対しては、C型肝炎ウイルスのようにウイルスの排除に通じるような効果は得られていない。この理由を明らかにするために、HBV蛋白質が、IFNシグナル伝達を阻害するかどうか検討することを第一の目的とする。

HBVでは、core蛋白質からなるヌクレオカプシドが、主としてHBs（S）およびpre-S1-S2-Sを含むエンベロープを獲得して成熟粒子が産生される。一方で、ヌクレオカプシドをもたない中空粒子が多数産生される。これらのウイルス粒子形成の機構を詳細に解明し、成熟粒子の合成を抑制する手段を見つけるべく、ウイルス様粒子の産生系を構築し、ウイルス粒子形成におけるウイルス蛋白質間相互作用と出芽機構について研究を行うことを第二の目的とした。

B. 研究方法

HBV広島YE株（Accession# AB206816）のゲノムcDNAから各蛋白質を発現するプラスミドを構築した。これを培養細胞に導入し、各蛋白質の発現をウェスタンブロット、蛍光抗体法で確認した。

レポーターアッセイは、プラスミドを293T細胞（T抗原発現ヒト腎臓上皮由来細胞）に導入して行った。HBV蛋白質発現プラスミドの他に、IFN- γ プロモーターあるいはIRF3プロモーター下に蛍ルシフェラーゼ遺伝子をもつレポータープラスミドを細胞に導入し、誘導剤としてセンダイウイルスCantell株を感染させた。あるいはレポータープラスミドとして、IFN stimulation responsive element（ISRE）の下流に蛍ルシフェラーゼ遺伝子をもつプラスミドを用い、精製ヒトIFN- γ あるいはCantell株で刺激した。海椎茸ルシフェラーゼ発現プラスミドを内部対照として用いた。

ウイルス蛋白質出芽の検討は、肝炎ウイル

ス蛋白質発現プラスミドを293T細胞に導入し、24時間後に上清と細胞をそれぞれ分取して行った。上清は超遠心後の沈殿を回収し、細胞は溶解し、それぞれウェスタンブロット法でウイルス蛋白質を解析した。

C. 研究結果

HBV広島YE株の蛋白質を発現させた。蛋白質は、HBs (S), Pre-S2-S, Pre-S1-S2-S, core, pre-core-core, HBe, X-HA (HAタグ付加), P-FLAG (FLAGタグ付加) であり、これらの発現をそれぞれの特異抗体あるいは分子タグに対する抗体で確認した。蛍光抗体法でも蛋白質発現と細胞内局在を確認した。

センダイウイルスCantell株を感染させると細胞内センサー分子RIG-Iが活性化され、IFN- β が誘導される。HBV蛋白質の中に、この経路を部分的に抑制するものが見つかった。特にP蛋白質は強い抑制能があった。分泌されたIFN- β は自己ならびに周辺の細胞のIFN- β / α 受容体に結合して、Jak/STAT系のシグナル伝達を介して、ISRE下流の抗ウイルス蛋白質、IRF7等の合成を誘導する。HBV蛋白質はこれも部分的に抑制したが、P蛋白質の強い抑制作用が際立っていた。

試験中に、対照の海椎茸ルシフェラーゼの活性もP蛋白質で強く抑制され、P蛋白質はIFNシグナル伝達を特異的に阻害するのではなく、蛋白質合成を全般的に抑制することが示唆された。この抑制について、転写プロモーターを変えても起こること、mRNAは大きく減少していないことから、転写ではなく、翻訳が全般的に抑えられていると考えられた。P蛋白質をさらにドメイ

ン毎に分けて発現するプラスミドを構築して検討したところ、逆転写酵素 (RT) ドメインに強力な蛋白質合成抑制作用があることを見いだした。

HBV蛋白質を293T細胞で単独で発現すると、HBs (S), Pre-S2-S, Pre-S1-S2-S, core, pre-core-core, HBeは培養上清に放出された。core蛋白質はC端側に特徴的な塩基性アミノ酸、特にアルギニンのクラスターをもっている。これを欠損した"short core"蛋白質は培養上清には検出できず、core蛋白質の放出には、C端側の塩基性アミノ酸が必要であると考えられた。塩基性アミノ酸クラスターは複数あり、これをC端側から順次削っていったところ、端から少なくとも2つのクラスターが細胞からの放出に重要であると考えられた。

D. 考察

HBV蛋白質によるIFNシグナル伝達阻害実験では、P蛋白質以外には明瞭な結果を得ることが出来なかった。P蛋白質は予想外に蛋白質合成全般を抑制し、特に翻訳を阻害すると推定された。P蛋白質によるアポトーシス誘導などの細胞傷害性について検討が必要である。

HBV蛋白質はそれぞれを発現させたところ、多種類の蛋白質が培養上清に放出された。超遠心による沈殿に回収されているので、いずれも何らかの構造物として培養上清に存在していると考えられる。HBsはシグナル配列をもっているため、分泌経路で細胞表面まで運ばれ、そこからウイルス粒子様の構造をとって出芽して放出されていると推測される。pre-core-coreにもN端に疎

水性アミノ酸のシグナル配列として働く部分があり、分泌経路を介して放出されていると考えられる。この場合には、細胞内と放出された蛋白質ではサイズが大きく異なり、放出にあたってプロセッシングを受け、HBe様の蛋白質に変化したものと考えられる。

HBeについては、前半の疎水性配列によって分泌経路を介した放出が考えられる一方で、coreは疎水性配列を欠き、分布経路に依存しないで細胞から放出されると考えられる。この場合には、coreのC末端側の塩基性アミノ酸クラスターが必須であった。この機構は不明である。

今後は、それぞれの放出経路、関与する宿主機能などの性質を解明し、複数のHBV蛋白質を組み合わせることで実際のHBV粒子に近いウイルス様粒子を作製することで、HBV粒子形成の詳細を解明する予定である。

E. 結論

HBV 広島 YE 株の蛋白質発現系を作製した。HBV 蛋白質の IFN シグナル伝達に対する影響は不明であったが、P 蛋白質（特に逆転写ドメイン）が全般的に蛋白質合成を抑制することを見いだした。また、いくつかのHBV 蛋白質が単独発現で細胞から放出されることを見いだした。各蛋白質の放出について、その性状と分子機構について検討する必要がある。

F. 健康危険情報

（総括研究報告書にまとめて記入）

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Irie T, Okamoto I, Yoshida A, Nagai Y,

Sakaguchi T Trans-regulatory polarity shift during the viral RNA synthesis dictates the negative genome polarity of the Mononegavirales. J Virol. 2014. 88:690-8.

2) Irie T, Yoshida A, Sakaguchi T Clustered basic amino acids of the small Sendai virus C protein Y1 are critical to its Ran GTPase-mediated nuclear localization. PLoS One 2013. 8:e73740

3) Ueda K, Kawabata R, Irie T, Nakai Y, Tohya Y, Sakaguchi T Inactivation of pathogenic viruses by plant-derived tannins: strong effects of extracts from persimmon (*Diospyros kaki*) on a board range of viruses. PLoS One 2013, 8: e55343

2. 学会発表

(1) 坂口剛正、柿タンニンによる多様なウイルスの不活化とその応用、第56回近畿アグリハイテクシンポジウム～柿タンニンの底力～、奈良、2013

(2) 坂口剛正、川端涼子、福士雅也、B型肝炎ウイルス蛋白質の性状解析、厚生労働省B型肝炎創薬実用化等研究事業、革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究、平成25年度3班合同班会議、広島、2013

(3) 小田康祐、的場康幸、川端涼子、入江崇、福士雅也、坂口剛正、自然免疫の抑制に関わるセンダイウイルスCタンパク質と宿主転写因子STAT1の構造生物学的解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013

(4) 星野羊一、入江崇、小田康祐、福士雅也、坂口剛正、センダイウイルスCantell株の増殖動態とIFN β 誘導の定量的解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013

(5) 坂口剛正、吉田明日香、入江崇、センダイウイルス感染によるストレス顆粒様構造の形成とIFN誘導におけるC蛋白質の関与、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013

(6) 入江崇、吉田明日香、川端涼子、坂口剛正、センダイウイルス株間の著しいインターフェロン誘導性の違いを生む因子、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013

(7) Yoshida A, Kawabata R, Sakaguchi T, Irie T, Paramyxovirus Sendai virus N protein plays a critical role on restricted production of copyback-type DI genomes to escape from detection by host innate immunity, The 12th Awaji international forum on Infection and Immunity, Awaji, 2013

(8) 坂口剛正、HBV蛋白質の性状解析、B型肝炎ウイルス蛋白質の性状解析、厚生労働省B型肝炎創薬実用化等研究事業、革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究、平成25年度茶山班会議、広島、2013

(9) 小田康祐、川端涼子、福士雅也、入江崇、坂口剛正、センダイウイルスCタンパク質と転写因子STAT1の相互作用の構造学的解析、第28回中国四国ウイルス研究会、広島、2013

(10) Irie T, Okamoto I, Yoshida A, Nagai Y, Sakaguchi T, A novel regulatory mechanism determining the genome polarity of the Mononegavirales, NSV2013, Granada, Spain, 2013

(11) Yoshida A, Kawabata R, Sakaguchi T, Irie T, Different production of viral RNA species between Sendai virus strains causes their

remarkable difference in IFN inducibility, NSV2013, Granada, Spain, 2013

(12) 坂口剛正、HBV蛋白質の性状解析、B型肝炎ウイルス蛋白質の性状解析、厚生労働省B型肝炎創薬実用化等研究事業、革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究、平成25年度茶山班班員ミーティング、広島、2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(1) 国内特許

特許第5421901号

発明の名称：エンテロウイルス属の非エンベロープに対する抗ウイルス剤および抗ウイルス用組成物

特許権者：国立大学法人広島大学、アルタン株式会社

発明人：島本整、沖中泰、坂口剛正、辻徹、中井義昭

出願番号：特願2010-505931

出願日：平成21年3月31日

登録日：平成25年11月29日

(2) ロシア特許 平成25年10月

国際出願番号：PCT/JP2010/056879

発明の名称：抗ウイルス剤及び洗浄剤

出願人：シャボン玉石けん株式会社、国立大学法人広島大学

発明人：川原貴佳、草場麻衣子、坂口剛正

ロシア出願番号: 20111146534

特許番号：2491929

特許期間満了日：2030年4月16日

(3) 中国特許 平成25年9月

同上

中国出願番号: 201080016783.2

