

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26年度)

B型肝炎ウイルス粒子形成に係わる宿主因子の同定とウイルス増殖抑制法の開発

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 (HBV) の粒子形成について、宿主因子である ESCRT あるいは Alix、tetherin が関与することを示した。これらについて HBV 増殖を抑制する方法を検討した。Core 蛋白質と Alix の直接的な相互作用を阻害することが有力な方法であると考えられた。他に Autophagy の HBV 粒子形成の関与については確実な結果が得られておらず、さらに検討が必要である。今後は、様々な網羅的な手法によって、HBV 増殖に関する新たな宿主因子の検索を行う予定である。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス (HBV) の粒子形成について、昨年度から研究を開始した。培養細胞にウイルス遺伝子を導入して HBV 複製を起こすシステム、あるいは HBV 蛋白質、特に HBs あるいは Core 蛋白質を発現してウイルス様粒子 (VLP) を産生させるシステムを用いて、粒子形成に必要な宿主因子あるいは阻害的に働く宿主因子を、様々な方法で検索する。宿主因子の候補について、詳細な生化学的・分子生物学的な解析を行い、その作用機構を解明する。さらに同定された宿主因子を直接的あるいは間接的に阻害する因子を研究して、HBV 増殖抑制法を開発し、抗 HBV 薬を開発するための基礎とする。

B. 研究方法

HBV 広島 YE 株 (Accession# AB206816) を主に用い、この 1.4 倍長全ゲノムをもつプラスミドを培養細胞 HepG2 あるいは T23, 293T に導入して、ウイルス複製と粒子形成をおこさせた。あるいは HBs 蛋白質を単独で発現させて生じるウイルス様粒子 (S-VLP)、Core 蛋白質によるウイルス様粒子 (C-VLP) を用いた。

各種の宿主因子の発現プラスミドあるいはドミナントネガティブ変異体 (DN 変異体) を用い、あるいは CRISPR/Cas9、shRNAi、siRNA を用いたノックアウト、ノックダウンを行った。宿主因子とウイルス蛋白質の相互作用を免疫共沈降法で、共局在を蛍光顕微鏡で検討した。

C. 研究結果

1 . ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport)

多小胞体での膜輸送、細胞質分裂に関与する宿主蛋白質複合体であり、HIV-1 をはじめとする多くのエンベロープウイルスの出芽に働くことが示されている。HBV、C-VLP 出芽は、ESCRT 機能を阻害する DN 変異体で出芽が阻害された。少なくとも成熟粒子の放出に ESCRT が関与している。S-VLP 出芽は阻害されなかったため、空粒子の出芽には関与していない可能性がある。

2 . Alix (ALG2-interacting protein X)

Alix は 868 残基の V 字型分子であり、膜に結合する。ESCRT の構成蛋白質の一つであるが、単独でも膜を湾曲させて、エクソゾーム形成、一部のウイルス出芽をおこすと考えられている。Alix と Core 蛋白質が直接結合することを確認し、そのそれぞれの結合ドメインを同定した。Alix の欠失変異体の一部で、HBV、C-VLP の出芽が抑制されることを観察しており、この変異体が DN 変異体として働いている可能性がある。S-VLP には全く影響を与えない。さらに確認が必要であるが、HBV の出芽に Alix と Core 蛋白質の結合が重要であることは、ほぼ確実と思われる。これを阻害することで HBV 増殖抑制効果が得られる可能性がある。

3 . Autophagy

我々は LC3 が、HBs 蛋白質や preS2-S 蛋白質、preS1-S2-S 蛋白質と共局在することを見いだして

おり、HBV 出芽と autophagy との関連が疑われた。現在のところ、autophagy 阻害剤 3-MA は、HBV あるいは S-VLP, C-VLP の出芽に影響がないというデータを得ている。一方、2011 に HBV 出芽に autophagy が関連しているという論文が発表されており、さらに異なる細胞、あるいは autophagy 促進剤を用いた検討が必要である。

4 . BST2/tetherin/CD317

インターフェロン誘導性の Type II 膜蛋白質であり、C 末端に GPI アンカーが結合することで、N 端、C 端の両方で膜に結合する分子である。HIV-1 において、細胞表面でウイルスを物理的に引き留めることで出芽を抑制することが明らかになっている。HIV-1 はその Vpu 蛋白質によって、tetherin の作用を不活化している。tetherin は過剰発現すると、C-VLP の出芽は阻害しないが、HBV および S-VLP の出芽を阻害した。従って tetherin は潜在的にウイルス出芽を阻害すると考えられる。

ところが、HBV 持続感染 HepG2 由来細胞 (T23 細胞) では、tetherin の siRNA によるノックダウンあるいは過剰発現で HBV の出芽は影響を受けないというデータがあり、持続感染細胞では tetherin の働きを無効化する機構があることが推測される。HBV 増殖が tetherin の阻害作用から逃れるような機構が存在する可能性があり、興味深い。

D. 考察

今年度は既報の HBV 出芽に関する宿主因子を中心として検討を行った。HBV 出芽への ESCRT の関与は明確であったが、ESCRT は生体に必須な働きをしているので、ウイルス抑制のために阻害することは困難である。一方で、Alix の変異体の一部が DN 変異体として働いたので、Alix と Core 蛋白質の相互作用を阻害すると HBV 増殖抑制につながる可能性がある。この相互作用を阻害する低分子化合物を検索する必要がある。

Autophagy が HBV の出芽に働いているかどうかについて、現時点では曖昧である。Autophagy が関与することが明らかになれば、Autophagy の制御は様々な薬剤によって、ある程度可能であるので、将来的に HBV 増殖抑制につながる可能性がある。

今後は、網羅的な手法を用いて、HBV 蛋白質と相互作用する宿主因子を検索することを予定している。

E. 結論

HBV 粒子形成に重要な宿主因子をいくつか同

定、確認することができた。これらをもとにして、HBV 粒子形成を抑制する方法の開発が期待できる。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、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) Latief MA, Chikama T, Shibasaki M, Sasaki T, Ko J-A, Kiuchi Y, Sakaguchi T, Obana A, Antimicrobial action from a novel porphyrin derivative in photodynamic antimicrobial chemotherapy *in vitro*. *Lasers Med. Sci.* 30(1):383-387, 2015

2) 坂口剛正、上田恭子、川端涼子、柿波でウイルス対策 柿タンニンによる強力なウイルス不活化作用、*ニューフードインダストリー* 56(11):17-24, 2014.

2 . 学会発表

(1) 竹中啓、富樫盛典、三宅亮、坂口剛正、秀道広、 π 環境中ウイルスの迅速検知システム、平成 26 年室内環境学会学術大会、東京、2014

(2) 坂口剛正、B 型肝炎ウイルスの細胞からの放出、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 26 年度 3 班合同班会議、大阪、2014

(3) 福士雅也、川端涼子、坂口剛正、B 型肝炎ウイルス P 蛋白質による全般的な蛋白質合成阻害、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014

(4) Takenaka K, Togashi S, Miyake R, Sakaguchi T, Hide M. Integrated micro-impaction cartridge covered with microporous light-blocking film for low-concentration airborne virus detection. The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, μ TAS 2014 Conference, San Antonio, USA, 2014

(5) Yoshida A, Kawabata R, Sakaguchi T, Irie T. IFN- α -inducible, unusual viral RNA species produced by paramyxovirus infection accumulated into distinct cytoplasmic structures in an RNA type-dependent manner. The 13th Awaji international forum on Infection and Immunity. 奈良、2014

(6) Yoshida A, Kawabata R, Sakaguchi T, Irie T. Paramyxovirus Sendai virus N protein plays a critical role in restricted production of copyback-type

defective-interfering genomes to escape from detection by host innate immunity. IUMS2014 XVI International Congress of Virology, Montreal, Canada, 2014

(7) Yoshida A, Kawabata R, Sakaguchi T, Irie T. Stress granule-like structures are not involved in recognition of Sendai virus infection. IUMS2014 XVI International Congress of Virology, Montreal, Canada, 2014

(8) 坂口剛正、川端涼子、福士雅也、小田康祐、入江崇、B型肝炎ウイルス蛋白質の性状解析、第29回中国四国ウイルス研究会、山口、2014

(9) 坂口剛正、小田康祐、入江崇、ウイルスによる自然免疫抑制の構造学的解析、平成26年度中四国乳酸菌研究会総会および研究発表会、岡山、2014

2. 特許申請

発明の名称：高マンノース型糖鎖分離デバイス

出願人：国立大学法人広島大学、旭化成メディカル株式会社

発明人：堀貫治、黒川洋、平山真、巖倉正寛、水口博義、坂口剛正他

出願番号：特願 2015-21620

出願日：2015年2月5日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

(1) 特許第 5593572 号

発明の名称：抗ウイルス剤及び洗浄剤

特許権者：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

出願番号：特願 2011-509373

出願日：平成 22 年 4 月 16 日

登録日：平成 26 年 8 月 15 日

(2) 特許第 5571577 号

発明の名称：A 型インフルエンザウイルス属のエンベロープウイルスに対する抗ウイルス性衛生用繊維製品

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 2010-542140

出願日：平成 21 年 12 月 11 日

登録日：平成 26 年 7 月 4 日

(3) 特許第 10-1426744 号 (韓国)

発明の名称：抗ウイルス剤及び洗浄剤

特許権者：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

出願番号：第 2011-7024542 号

出願日：2011 年 10 月 18 日

登録日：2014 年 07 月 30 日