

B型肝炎ウイルスの中空粒子のタンパク質は p22cr ではなく HBc/p21 である

研究協力者 高橋 和明¹⁾

¹⁾ 広島大学 大学院医系科学研究科 疫学・疾病制御学

研究要旨

これまで B 型肝炎ウイルスの中空粒子のタンパク質は p22cr であると結論づけられ、多くの臨床検体が HBcrAg キットで測定されてきたが、Hong 等が p22cr は中空粒子には存在しないと報告しており、HBcrAg の組成を正しく理解することが重要である。

A. 研究目的

2005 年、kimura 等(J Biol Chem,2005; 280:21713) は、HBV 感染者の血清中に観察される DNA-free の Dane 粒子(中空粒子)のキャプシドのタンパク質は、DNA ゲノムとの結合に関わるアルギニンリッチの C 末端ドメイン(CTD)を欠いた、シグナルペプチド含有 PreC 由来のタンパク質(p22cr)であると報告したが、2021 年に Hong 等(J Virol ,2021,95:1695)は DNA 含有 Dane 粒子と中空粒子のキャプシドの主成分は HBc(p21)で、PreC 由来のタンパク質はキャプシドを形成できず、p22cr は中空粒子には存在しないことを明らかにした。また、Inoue 等による高感度 B 型肝炎コア関連抗原測定法(iTACT-HBcrAg)に関する論文(J Hepatol. 2021; 75: 302)では、HBcrAg 測定法が検出する成分の定義も重要で、CsCl 勾配分画による遠心分離と HBcAg 特異抗体でこの点を明確にできることを報告している(J Hepatol. 2021; 75: 997)。

B. 研究方法

これまでに発表した HBcrAg に関連するデータをまとめました(図 A-G)。

C. 研究結果

本研究班では、B 型肝炎研究の初期から、日本赤十字社血液センターから提供して頂いた HBV 無症状キャリアの血液を用いて、Dane 粒子と HBeAg の免疫化学的性質を解析してきた。ウイルスの本態である Dane 粒子については、大量の材料を用いて様々な精製方法を試みた結果、CsCl を用いた遠心分離により DNA 含有 Dane 粒子(当時は DNA ポリメラーゼを測定)と DNA フリーDane 粒子を分離することができた。但し、DNA 含有 Dane 粒子については微量しか含まれておらず、タンパク質や免疫化学的性質を示す量を得ることは困難であった。Hong 等も、血清中に存在する HBc の量は、ほとんどが空ビリオンによるもので、DNA ビリオンは 10^9 粒子/ml、空ビリオンは 10^{11} 粒子/ml であると報告している。

Dane 粒子(DNA ポリメラーゼ陰性画分を用いていた)のキャプシドから精製した p21 のアミノ酸組成は、HBcAg をコードする B 型肝炎ウイルス DNA の配列から推定される 183 アミノ酸配列の組成と驚くほど類似していた(A)(B)。

また、p21 と各種抗体との結合試験において、アルギニンリッチの C 末端ドメインを認識する抗 p21 (mAb2212)とは結合したが、PreC 抗体とは結合しないことがわかった(F)。これらのデータから、

B型肝炎ウイルスの中空粒子は p22cr ではなく HBe/p21 であることが明らかであった。

血清中の HBeAg をアフィニティークロマトグラフィーで精製したところ(C)、HBeAg/p17 よりかなり大きな HBeAg ポリペプチドが予想外に見つかり、SDS-PAGE 上の移動位置から p20^e と名付けた。p20^e は、N 末端に MQLFHLXLII (X 未知) の配列を持ち、PreC 領域生成物のアミノ酸 1~10 に相当した(D)。抗体との結合試験では、p20^e は PreC 抗体と結合するが、抗 p21(No.2212)とは結合しないことが確認された(F)。

血清中からの PreC 由来のタンパク質 p20^e は中空粒子のタンパク質 "p22cr" と類似していた。

(A) Purification of HBc

Dane particles were purified from plasma 30 liter containing subtype adr HBsAg and HBeAg. Dane particles (DNA polymerase negative fraction) were separated in a series of steps including pelleting, flotation centrifugation with CsCl, and rate zone centrifugation.

↓ 高橋和明 等, 日本臨床.1974, 32巻12号3472
Takahashi K, et al, J.Gen.Virol.1981,57:325

Purification of HBV core particles

↓

SDS-PAGE

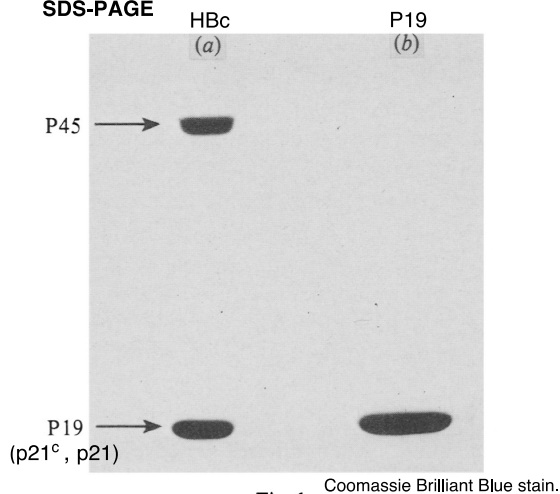


Fig. 1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of polypeptides derived from cores of Dane particles. When cores of Dane particles were treated with 2-mercaptoethanol and SDS, two polypeptides, P19 and P45, were liberated (a). P19 was separated from P45 by electrophoresis (b), and used for immunization and amino acid analysis. Early studies showed p21 or p21^c as P19

Early studies showed p21 or p21^c as P19

(B) Amino acid analysis of P19

The amino acid composition of P19 (p21^c, p21) was found to be remarkably similar to the composition of the 183 amino acid sequence encoding HBc.

Table 1. Amino acid composition of HBeAg polypeptide (P19)

Amino acid	P19			HBcAg polypeptide* from HBV DNA	
	Mol. %	Moles	Nearest whole no.		
Lys	1.2	2.0†	2	2	3
His	2.3	3.8	4	4	4
Arg	12.9	21.5	22	24	8
Asp	7.3	12.2	12	13	11
Thr	5.6	9.3	9	14	8
Ser	10.3	17.3	17	17	13
Glu	9.6	16.2	16	14	12
Pro	10.2	17.1	17	16	11
Gly	5.1	8.6	9	7	11
Ala	6.3	10.6	11	11	9
Cys	—	—	(4)‡	4	(3)
Val	5.8	9.8	10	12	10
Met	1.5	2.4	2	2	2
Ile	3.7	6.3	6	5	6
Leu	11.9	19.8	20	21	20
Tyr	2.4	4.1	4	5	4
Phe	3.9	6.6	7	8	6
Trp	—	—	(4)‡	4	(4)
Amino acids			177	183	
Molecular size			20079	21042	

*Amino acid composition of HBcAg polypeptide deduced from the nucleotide sequence described by Pasek et al.

Takahashi K, et al, J.Gen.Virol.1981,57,325

P15.5 (p17) of HBeAg polypeptide in serum was purified and tested for amino acid composition. The amino acid composition of P15.5 closely resembled that of the first 149 amino acid residues from the N-terminus of the gene encoding P19(p21).

Takahashi K, et al, J. Immunol.1983, 130,2903

(C) Purification of HBeAg

Sera were pooled (5 liter) 70 carriers of HBsAg of subtype adr. HBeAg in serum was purified by affinity chromatography (using anti-HBe/b).

↓ SDS-PAGE

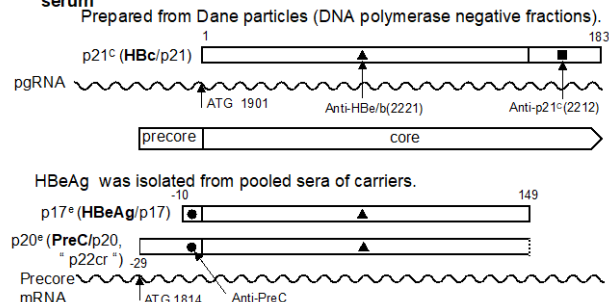
↓ P17^e, p20^e

(D) N-terminal amino acid sequence analysis of p17^e and p20^e in serum

p17^e SKLXLGXGXGMDI DPXKEFG- (HBeAg/p17)
p20^e MQLFHLXLII- (PreC/p20, "p22cr")

PreC Core
-29 1
MQLFHLCLII SCSCPTVQASKLCLGWLWGMDI DPYKEFGASVELLSFLPSDFFP
SI RDLLDTASALYREALESPHCSPHHTALRQAI LQWGLMNLATWGSNLEDP
ASRELVVSYYVNVNMGKIKI RQLLWFHI SCLTF GRETVLEYLVSFQVM RTPTAYR
PPNAPI LSTLPEVVVRRGRSPRRRTPSRRRSQSPRRRSQSRRESQC 83
CTD

(E) Schematic representation of biosynthesis of HBc/p21 derived from Dane particles and HBeAg/p17 and PreC/p20 derived from serum



(F) Analysis of HBeAg polypeptides by enzyme immunoassay

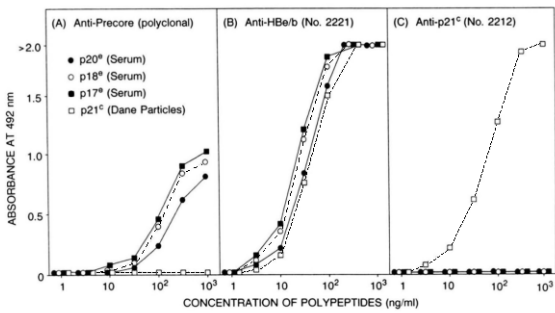


Figure 3. Antigenic determinants expressed on various HBeAg polypeptides. p20^e, p18^e, and p17^e isolated from serum pool, as well as p21^c prepared from Dane particles, were fixed on a solid-support, and tested for the binding with various antibodies by enzyme immunoassay. A. Guinea pig polyclonal antibodies raised against amino acids 20 to 29 of the precore-region product; B. monoclonal anti-HBe/b; C. mAb against the carboxyl-terminal domain of p21^c.

Takahashi K, et al, *J. Immunol.* 1991, 147: 3156

(G) Analysis of HBeAg polypeptide in serum by Western blotting

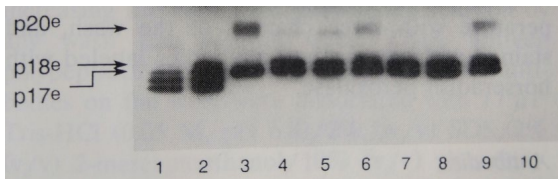


Fig. 3. Migration positions of regular (p17e and p18e) and large (p20e) HBeAg polypeptides are indicated on the left. Lanes 1-9 were from HBeAg-positive carriers, and lane 10 was from a normal control without markers of HBV infection.

Takahashi K, et al, *J Immunol Methods.* 1993, 157 : 217

D. 考察

血清中の Dane 粒子（DNA ポリメラーゼ陰性画分）は、ベレット化、CsCl による浮上遠心分離、レートゾーン遠心分離を含む一連のステップで比重は約 1.23-1.24 の分画に分離された。

kimura 等(*J Biol Chem*, 2005; 280:21713)は、シヨ糖密度勾配遠心分離の繰り返しで、中空粒子を第 1 回目が比重は約 1.12、第 2 回目が比重は約 1.17 の画分に分離されているが、血清中の HBeAg と PreC 由来のタンパク質は密度も大きさも不均一で (*Proc.Natl.Acad.Sci.* 1978,75;1952), (*J Virol*, 2021,95:1695)、シヨ糖密度勾配遠心だけの分離では中空粒子の分画に PreC 由来タンパク質が混入していた可能性がある。HBcrAg キットでは、HBc (core 粒子を破壊するので主に HBeAg)、HBeAg、

シグナルペプチド含有 PreC 由来タンパク質 p20e/"p22cr"の複合抗原を検出すると推測しているが、将来的には、HBeAg (core 粒子)、シグナルペプチド含有 PreC 由来タンパク質を別々に測定するキットも必要になると考える。

E. 結論

B 型肝炎ウイルスの中空粒子の主要タンパク質は p21 である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
特になし。
2. 学会発表
特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし。

