

【総 説】

B型肝炎ウイルス産生のメカニズム
—— クリオ電子顕微鏡 (cryo-electron microscopy) により
解明されたコア粒子の立体構造と Large S 蛋白の役割 ——

東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター・臨床医学研究所

高橋 弘 吉川 哲 矢

東京慈恵会医科大学内科学講座消化器・肝臓内科

戸 田 剛太郎

MOLECULAR MECHANISMS OF PRODUCTION OF HEPATITIS B VIRUS
—— **THREE-DEMENSIONAL MAP OF CORE PROTEIN SHELL VISUALIZED**
BY CRYO-ELECTRON MICROSCOPY ——

Hiroshi TAKAHASHI and Tetsuya YOSHIKAWA

Institute of Clinical Medicine and Research, The Jikei University School of Medicine

Gotaro TODA

*Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine,
The Jikei University School of Medicine*

The electron cryomicroscopy technique demonstrated three-dimensional map of core particle of hepatitis B (HB) virus using ice embedding. The icosahedral-shaped core particle shows protruding spikes on the surface of the shell. Each spike is arranged with dimer of HB core protein. It is of interest that the binding of [³⁵S]-labeled large HBsAg (large S protein) to HBcAg was inhibited by the synthetic peptides bearing the octapeptide sequence 'SLLGRMKG', which was identified as a ligand to native core particle (HBcAg). Furthermore, the two flanking amino acids to the 'SLLGRMKG' octapeptide was found to increase the binding affinity to HBcAg and this synthetic peptide (GSSLGRMKGA) inhibited the binding of large S protein to HBcAg most effectively. Hep G2 cells were transfected with replication-competent HBV construct in the presence or absence of peptide. HBV production was inhibited by the inhibitory peptides (SLLGRMKG, SLLGRMKGA, GSSLGRMKGA), but not by irrelevant peptide (ALLTRILG). The relative inhibitory effects of the three peptides reflected their affinities for HBcAg. The pre-S regions of large S protein were found to be important for viral assembly and attachment to the host cell during infection. We demonstrated that specific interactions between the outer surface of the core and the inner surface of the envelope are likely to guide correct assembly of the virus and stabilize the resulting particle. Therefore, peptides that bind to core protein may inhibit the assembly of HBV particles.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2003; 118: 1-8)

Key words: hepatitis B virus, core particle, large S protein, peptides, anti-virus effect

I. はじめに

B型肝炎ウイルス (HBウイルス) は、不顕性感染から致死的な劇症肝炎に至るまで色々な形の感染症を起こすことが知られている¹⁾。B型急性肝炎は通常、ウイルスの episomal な増殖によって起こり、ウイルスと感染細胞の排除によって治癒すると考えられている。また、無症候性キャリアーが存在することから、B型肝炎ウイルスには直接の肝細胞障害性はなく、ウイルス抗原に対する免疫反応が、肝炎の発症に重要とされている²⁾。日本では近年減少の傾向にあるとは言え、世界的には未だ2億人以上 HBウイルス慢性キャリアーがいることから、HBウイルス感染症はグローバルな医療問題として重要である。また、HBウイルスの慢性キャリアーは正常人の200倍以上のリスクで肝細胞癌を発症することが疫学的に明らかになっており、最近ではC型肝炎の癌化にHBウイルスの潜在的な感染が関与している可能性も指摘されている。

本稿ではクリオ電子顕微鏡 (cryo-electron microscopy) により初めて可視化されたコア粒子の立体構造を紹介するとともに、感染力を持つHBウイルスが小胞体において産生される機序にHBウイルスのエンベロープ蛋白の1つである large S蛋白が必須の役割を果たすことを明らかにしたので、この新知見を含めてHBウイルスの増殖および産生機序について概説する。

II. HBウイルスゲノムの構造

HBウイルスのゲノムは全長約3.2 kbの環状二本鎖DNAで、その一部は一本鎖構造(不完全二重鎖構造)になっている。ウイルスゲノムには、蛋白として翻訳可能な4つの open reading frame (ORF) が存在する (Fig.1)。S ORF は、HBs抗原を構成する3種類のエンベロープ蛋白、すなわち、large S蛋白 (pre-S1 と pre-S2 と S領域を含む)、middle S蛋白 (pre-S2 と S領域を含む)、そして small S蛋白 (S領域のみからなる) をコードする。コア ORF は、コア蛋白とプレコア蛋白をコードする。コア蛋白はコア粒子を構成し、プレコア蛋白は19個の疎水性シグナルペプチドとC末端のアルギニンに富んだ34個のアミノ酸残基

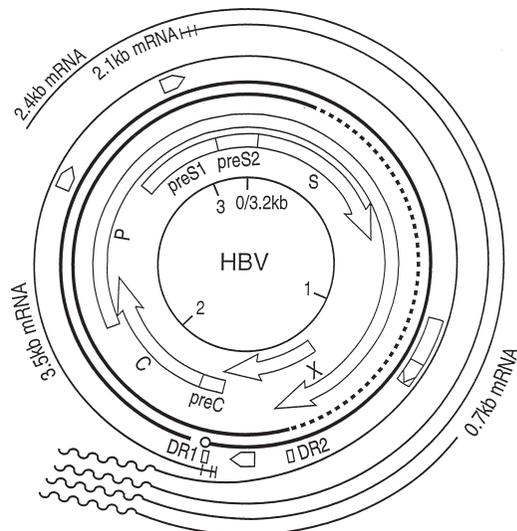


Fig. 1. Structure of HBV Genome

The hepatitis B virus is a circular, partially double-stranded DNA, 3.2 kb in length, which replicates via an RNA intermediate and has the capacity to integrate randomly into the host genome. There are four open reading frames in this virus; S, C, X, and polymerase (P) ORF. SORF encodes three proteins, preS1, preS2 and S protein. These are envelope proteins of this virus. Core ORF encodes two proteins, precore and core antigen. Core protein forms nucleocapsid and precore protein produce HBeAg after the cleavage of 19-aminoacid hydrophobic signal peptide and the 34-aminoacid arginine-rich C-terminal regions. X ORF encodes for X transactivator protein which may be involved in a hepatocarcinogenesis. Polymerase (P) ORF encodes for a putative reverse transcriptase. There are four translational reading frames. The largest transcript, 3.5 kb mRNAs contain precore, core mRNA and pregenome RNA. This pregenome RNA serves as a template for HBV DNA and important for replication of the virus. 2.4 kb mRNA consist of a pre S1 mRNA and pre S2, and S mRNA is 2.1 kb. Shortest 0.7 kb transcript is X mRNA.

が切断された後に HBe 抗原となる。X ORF は、ウイルスの増殖や肝細胞癌の発症に関与すると考えられている X 蛋白をコードする。また、ポリメラーゼ ORF は、逆転写酵素活性を有する DNA ポリメラーゼ蛋白をコードする。

III. 肝細胞内における HB ウイルスの増殖様式

HB ウイルスは特異的レセプターを介して肝細胞膜に結合し、エンドサイトーシスにより細胞内に侵入すると考えられている (Fig. 2)。肝細胞内に入る時にエンベロープ (HBs 抗原) が外れ、HB ウイルスゲノムを含んだコア粒子となる。さらに、コア粒子は細胞核に移行し、HB ウイルスの不完全二重鎖の DNA は DNA ポリメラーゼの働きで完全二重鎖となる。

そして、細胞由来の RNA ポリメラーゼの働き

により、ウイルスゲノムの (-) 鎖を鋳型として、複数の mRNA が作られる。これらは長さの違いで 4 種類 (3.5 kb, 2.4 kb, 2.1 kb および 0.7 kb mRNA) に分類されている (Fig. 2)。とくに、3.5 kb mRNA の中で最も長い mRNA であるプレゲノム RNA は、ウイルス DNA の (-) 鎖の鋳型となり、ウイルスの複製に重要である。また、3.5 kb mRNA にはコア mRNA、プレコア mRNA およびポリメラーゼ mRNA など含まれる。コア mRNA からは HBc 抗原が翻訳され、auto-assembly により球形のコア粒子が作られる。ポリメラーゼ mRNA からは DNA ポリメラーゼ蛋白が翻訳される。

コア粒子は、プレゲノム RNA と DNA ポリメラーゼを粒子内に取り込むと、DNA ポリメラーゼの N 末端をプライマーとして利用し、DNA ポ

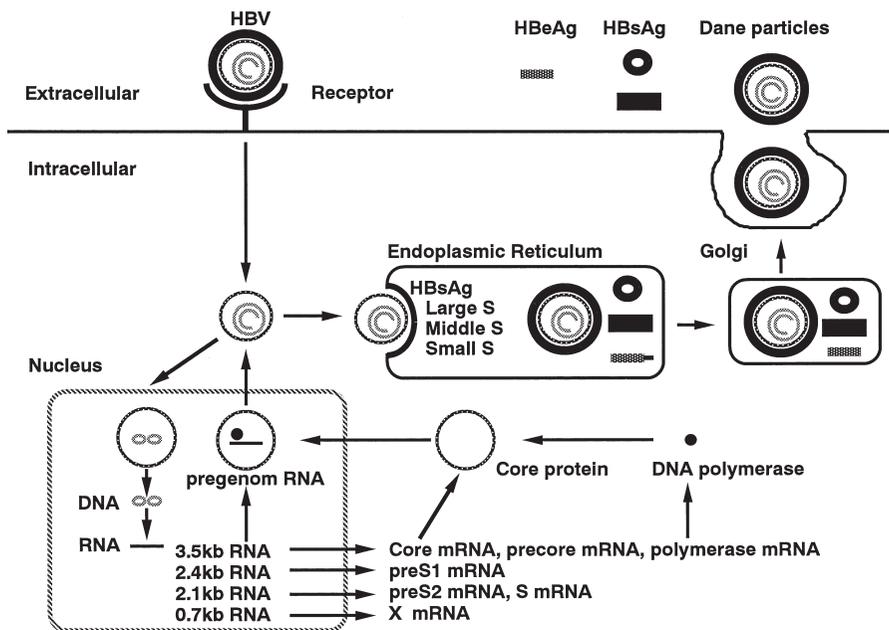


Fig. 2. Life cycle of HB virus

This cartoon demonstrates a natural life cycle of HBV. HBV enters hepatocytes by a putative receptor mediated endocytosis process. After entering the cell, it releases the nucleocapsid (core particle) from envelope. The viral genome is then translocated to the nucleus. It is converted into full-length circular HBV DNA by DNA polymerase. Four species of mRNAs are transcribed using cellular RNA polymerase II, and only 3.5 kb pregenomic RNA is encapsidated into subviral cores and serves as a template for HBV DNA replication. The minus strand of HBV DNA is synthesized by reverse transcriptase in the core particle, and then the double stranded HBV DNA is synthesized. The size of mature HBV DNA is 3.2 kb in size. HBV particles are secreted after they are encapsulated with envelope protein in endoplasmic reticulum. It is important to note that some of the intracellular HBVs are recycled into nucleus and produce HBV.

リメラーゼの逆転写活性により、ウイルス DNA の (-) 鎖を合成する。さらにこの (-) 鎖を鋳型として、DNA ポリメラーゼ活性によりウイルス DNA の (+) 鎖の合成が開始される。しかし、その反応は途中で止まるため、HB ウイルスゲノムは不完全二重鎖構造となる。

IV. デーン粒子の組み立ては小胞体で行われる

HB ウイルスゲノムを持ったコア粒子が感染力を持った完全なウイルス粒子 (デーン粒子) となるためには、HB ウイルスに特異的なエンベロップに被われる必要がある。また、ウイルス粒子の組み立て (assembly) を正しくガイドし、安定させるためには、コア粒子の表面とエンベロップの内側との間に特異的な相互作用が必要と考えられる。ウイルス粒子形成に重要なこのプロセスは、コア粒子が細胞質から小胞体を通過する際に達成さ

れる (Fig. 2)。そして、できたデーン粒子はゴルジ体を経て細胞外に分泌される。また、コア粒子の一部は核内にリサイクルされ、ウイルス粒子を再び産生する (Fig. 2)。

V. コア粒子の表面には規則的な突起構造が存在する

クリオ電子顕微鏡で得られた数千におよぶ画像をコンピュータでイメージ処理することにより、コア粒子の詳細な立体構造が明らかになった³⁾。クリオ電子顕微鏡は X 線解析のように目的の分子を結晶化する必要がなく、さらに複数の分子の相互作用を、少なくとも 10 Å の解像度で三次元的に解析できる新しい手法である。Fig. 3 にコア粒子の立体構造を示す⁴⁾。コア粒子の内部は空洞構造になっており、その内部にプレゲノム RNA が入っている。また、コア粒子の表面には規則的な

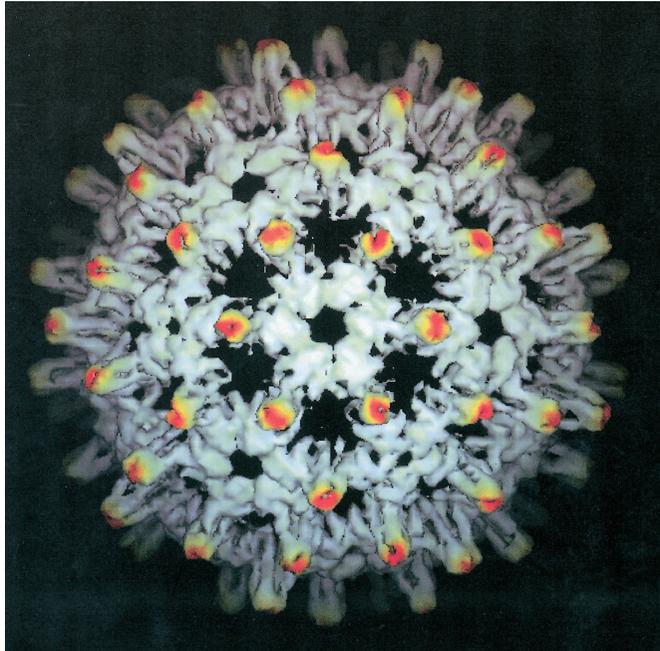


Fig. 3. Three-dimensional Map of Whole Core Protein Shell Visualized by Cryo-electron Microscopy

This figure demonstrates three-dimensional map of HB core particle visualized by cryo-electron microscopy. The electron cryomicroscopy technique employs ice embedding. This technique is able to look at structures that do not crystallize, and which can not therefore be studied by X-ray crystallography. In addition, solving the atomic structure is possible (extends to atomic resolution of 3 to 4 Å). The icosahedral-shaped core particle shows protruding spikes on the surface of the shell. Each spike is arranged with dimer of HB core protein. The shell of the core particle is penetrated by small pore. Inhibitory peptides are show in red color at the tips of spikes. (EMBO J, Volume 17, 1998)

突起構造 (spike) が見られる。この突起構造は2分子のコア蛋白の dimer で構成されており、コア蛋白の α -helix を形成する部位がヘアピン状にUターンすることで、突起構造を形成している。ちなみに、コア蛋白で抗原性が最も強い領域、すなわちアミノ酸残基で74から83番目の領域の immunodominant region は、この突起構造の先端に位置する。また、突起構造と突起構造の間には多数の細孔 (pore) が存在するが (Fig. 3)、ウイルス DNA の合成に必要な物質はこの細孔を介して自由にコア粒子内に入出入りすると考えられる。

VI. large S 蛋白はデーン粒子形成に不可欠である

HB ウイルスのエンベロープは、HBs 抗原を含む小胞体由来の脂質二重膜で構成されている。HBs 抗原には large S 蛋白, middle S 蛋白, そして最も大量に存在し HBs 抗原の主たる構成成分である small S 蛋白の3種類が存在する。

1991年、松原らのグループ⁵⁾と Ganem らのグループ⁶⁾は、デーン粒子の産生に large S 蛋白の存在が絶対不可欠の条件であることを示した。すなわち、large S 蛋白に欠損が生じるとデーン粒子の産生されないことが明らかにされた。この報告は、pre-S1 と pre-S2 領域を持つ large S 蛋白がウイルスの感染だけでなく、ウイルスの組み立て (assembly) にも関与することを示した初めての報告である。しかし、large S 蛋白がどのような機序でウイルスの組み立てに関わるかについては全く不明であった。

VII. large S 蛋白の pre-S1 / pre-S2 領域は小胞体の細胞質側に局在する

HB ウイルスの肝細胞への吸着と感染に関与すると考えられている pre-S1 や pre-S2 領域はデーン粒子の表面に局在するため、小胞体においてはその内腔側に局在すると考えられていた。しかし、1994年、小胞体における large S 蛋白の pre-S1 と pre-S2 領域のトポロジー (局在様式) について、それまでの定説を覆す研究成果が2つのグループにより同時に報告された⁷⁾⁸⁾。すなわち、分子生物学と生化学的手法を駆使した詳細な

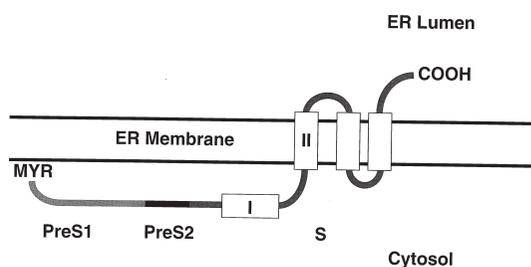


Fig. 4. Topology of HBs Large Protein at the Membrane of Endoplasmic Reticulum
The pre-S regions (pre-S1 and S2) are believed to play a role in both viral assembly and attachment to the host cell. Most of these pre-S residues are displayed on the surface of mature virions and hence would be expected to be translocated into the endoplasmic reticulum (ER) lumen during biosynthesis. However, contrary to this expectation, it was demonstrated by the group of Don Ganem using a coupled in vitro translation/translocation system that virtually all pre-S residues of the large protein are cytoplasmically disposed in the initial translocation products.

検討により、pre-S1 領域と pre-S2 領域は実は小胞体の細胞質側に局在することが明らかにされたのである。Fig. 4 に小胞体における large S 蛋白の局在様式を模式的に示す。図の中央に小胞体膜、下に細胞質、上に小胞体の内腔側を示す。デーン粒子の表面に存在するため、小胞体では内腔側に局在すると考えられていた pre-S1 および pre-S2 領域は、この図のように両者ともに細胞質側に局在することが明らかにされた⁷⁾⁸⁾。

VIII. コア粒子とエンベロープの特異的相互作用は large S 蛋白を介する

Random-hexapeptide phage display library を用いて、コア粒子と結合するペプチド配列をスクリーニングした結果、コア粒子に特異的に結合するペプチド SLLGRMKG が濃度依存的にコア粒子と large S との結合を抑制することが明らかとなった (Fig. 5)。また、この抑制ペプチドの片側あるいは両側にアミノ酸残基を追加してコア粒子とのアフィニティを高めた合成ペプチドは、さらに強い抑制効果を示した (Fig. 5)。これに対して、コア粒子と結合しない small S 蛋白由来の非特異的ペプチド配列 (ALLTRILG) では、全く抑

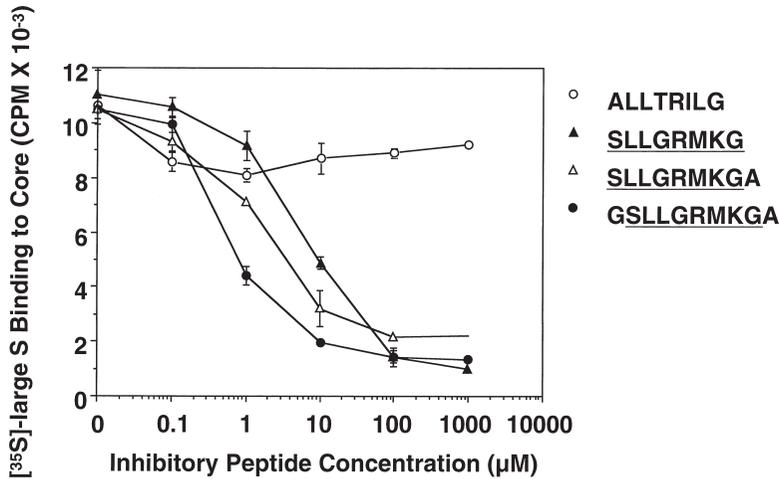


Fig. 5. Inhibition of HBs Large Protein Binding to HBcAg by the Synthetic Peptide GSLLGRMKGA

The binding of [³⁵S]-labeled HBs large protein to HBcAg was inhibited by the synthetic peptides bearing the octapeptide sequence 'SLLGRMKG', which was identified as a ligand to native core particle (HBcAg). Synthetic peptides bearing the octapeptide sequence 'SLLGRMKG' inhibited the binding of large S protein to HBcAg in a dose-dependent manner. Furthermore, the two flanking amino acids to the 'SLLGRMKG' octapeptide was found to increase the binding affinity to HBcAg and this synthetic peptide (GSLLGRMKGA) inhibited the binding of large HBsAg to HBcAg most effectively. In contrast, a peptide, ALLTRILG, which is identified as the 21-27 amino acid sequence within the S region, did not show any inhibitory effect. The peptide, ALLTRILG, includes amino acids of 21-27 of the S region of HBsAg. It shows a highly significant sequence match of five residues with the inhibitory peptide, ALLGRMKG, but had no inhibitory effect on the interaction between HBcAg and large HB Ag.

制効果が認められなかった。

さらに、クリオ電子顕微鏡を用いて抑制ペプチドがコア粒子のどの部分に結合するかを検討した結果, Fig. 3 に示すように, 抑制ペプチドはコア粒子の突起構造の先端に特異的に結合した⁴⁾。

IX. コア粒子の突起構造に結合するペプチドは HB ウイルスの産生を抑制する

次に, 各種合成ペプチドの抗ウイルス作用を検討した. Fig. 6 に HB ウイルス DNA をトランスフェクションした培養肝細胞 (Hep G2 細胞) を用いた実験結果を示す. 抑制ペプチド (SLLGRMKG, SLLGRMKGA および GSLLGRMKGA) は, HB ウイルスの産生を強く抑制した。

X. ま と め

HB ウイルス粒子の形成には, コア粒子の表面とエンベロープの内側との間に特異的な相互作用

が必要と考えられる. また, このプロセスはコア粒子が小胞体を通過する過程で起こる. 我々の研究結果により, 小胞体におけるこの特異的相互作用がコア粒子の突起構造の先端と large S 蛋白の pre-S1 と pre-S2 領域との間で起こり, デーン粒子が形成される事が明らかとなった (Fig. 7).

また, コア粒子の突起構造の先端に特異的に結合する抑制ペプチドが, HB ウイルスの産生を抑制し, 強い抗ウイルス作用を持つ事を明らかにした。

以上の結果より, ウイルスの assembly を阻害する小さな分子を用いて, ウイルスの産生をブロックする新しいタイプの抗ウイルス療法を開発できる可能性が示された。

原稿の校正と図表の作成に尽力を頂いた野呂裕子氏, 宇賀英子氏, および総説執筆の機会を与えて下さった川村将弘教授, 共同研究者の Kenneth Murray 教授ならびに Tony Crowther 教授に深謝いたします。

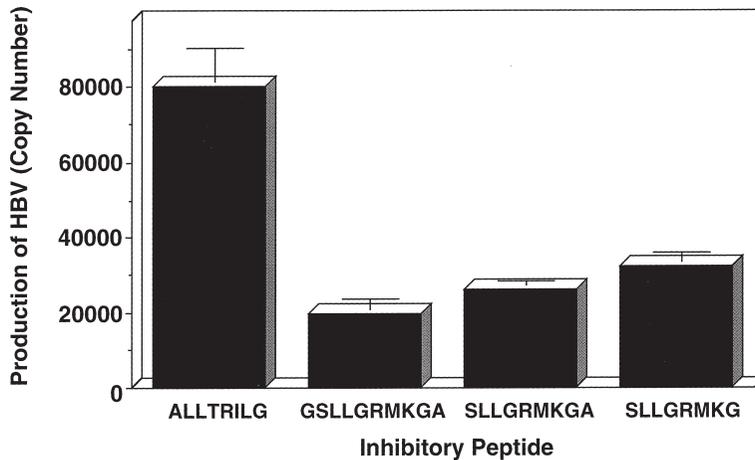


Fig. 6. Inhibition of HBV Production by Inhibitory Peptides in HBV-transfected Hep G2 Cells In order to determine whether these peptides could interfere with virus production by blocking its assembly, Hep G2 cells were transfected with replication-competent HBV construct in the presence or absence of peptide. We introduced $10 \mu\text{g}$ of pHBV-HTD DNA and $500 \mu\text{M}$ of peptide into the Hep G2 cells simultaneously by permeabilization of cell membrane. Following 72hrs incubation, HBV production in the culture supernatant was examined. For quantification of the production of HBV in the culture supernatant, a radioactive PCR method was used after DNase digestion and immunoprecipitation of HBV particles with a monoclonal antibody specific for HBsAg. As demonstrated in this figure, HBV production was inhibited by the inhibitory peptides (SLLGRMKG, SLLGRMKGA, GSSLGRMKGA), but not by irrelevant peptide (ALLTRILG). The relative inhibitory effects of the three peptides reflected their affinities for HBsAg.

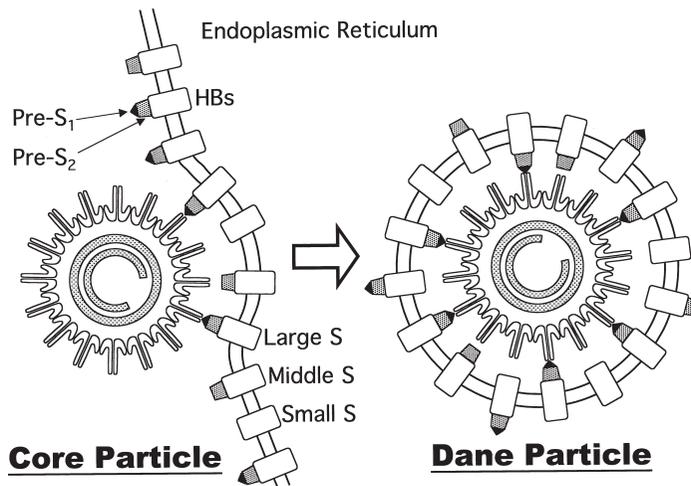


Fig. 7. Assembly of Dane Particle at endoplasmic membrane Large S protein is required for Dane particle formation, and it is postulated that sequence in pre-S1 and/or pre-S2 region interacts with the surface of core protein. These pre-S regions of large S protein were found to be important for viral assembly and attachment to the host cell during infection. Since pre-S sequences are found on the external surface of the virion envelop, during of following budding, a dramatic reorganization of either the envelope proteins or the lipid bilayer (or both components) must occur to allow surface display of these sequences. In some molecules, the pre-S region is translocated across the lipid bilayer and exposed on the virus surface. We demonstrated that specific interactions between the outer surface of the core and the inner surface of the envelope are likely to guide correct assembly of the virus and stabilize the resulting particle. Therefore, peptides that bind to core protein may inhibit the assembly of HBV particles.

文 献

- 1) Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985 ; 317 : 489-95.
- 2) Takahashi H, Fujimoto J, Hanada S, Isselbacher KJ. Acute hepatitis in rats expressing human hepatitis B virus transgenes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 1470-74.
- 3) Conway JF, Cheng N, Zlotnick A, Wingfield PT, Stahl SJ, Steven AC. Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. *Nature* 1997 ; 386 : 91-4.
- 4) Bottcher B, Tsuji N, Takahashi H, Dyson MR, Zhao S, Crowther RA, et al. Peptides that block hepatitis B virus assembly: analysis by cryomicroscopy, mutagenesis and transfection. *EMBO J* 1998 ; 17 : 6839-45.
- 5) Ueda K, Tsurimoto K, Matsubara K. Three envelope proteins of hepatitis B virus: large S, middle S, and major S proteins needed for the formation of Dane particles. *J Virol* 1991 ; 65 : 3521-9.
- 6) Bruss V, Ganem D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 1059-63.
- 7) Ostapchuk P, Hearing P, Ganem D. A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *EMBO J* 1994 ; 13 : 1048-57.
- 8) Bruss V, Lu X, Thomssen R, Gerlich WH. Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *EMBO J* 1994 ; 13 : 2273-9.