

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 肝炎等克服緊急対策研究事業
(英語) Program for Basic and Clinical Research on Hepatitis

研究開発課題名： (日本語) 新規薬剤開発に資する B 型肝炎ウイルス POL タンパク質発現系の構築
(英語) Development of novel protein synthesis system to produce active hepatitis B virus (HBV)-POL that contributes to the drug discovery

研究開発担当者 (日本語) 杉山 真也

所属 役職 氏名： (英語) Genome Medical Sciences Project, Vice Project Leader, Masaya Sugiyama

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) HBVPOL 蛋白活性の分子機構の解析と薬剤スクリーニング系の構築

開発課題名： (英語) Analysis of molecular basis and development of drug screening system using active HBV-POL protein

研究開発分担者 (日本語) ゲノム医科学プロジェクト 副プロジェクト長 杉山真也

所属 役職 氏名： (英語) National Center for Global Health and Medicine, Vice Project Leader, Masaya Sugiyama

分担研究 (日本語) HBVPOL 抗体の作成と検査系への応用

開発課題名： (英語) Development of antibodies against active HBV-POL and the application to test kit

研究開発分担者 (日本語) ゲノム医科学プロジェクト プロジェクト長 溝上雅史

所属 役職 氏名： (英語) National Center for Global Health and Medicine, Project Leader, Masashi Mizokami

分担研究 (日本語) 新規薬剤開発に資する B 型肝炎ウイルス POL タンパク質発現系の構築

開発課題名： (英語) Development of expression system for active HBV-POL protein

研究開発分担者 (日本語) 基礎生物学研究所 特任教授 西村 幹夫

所属 役職 氏名: (英語) National Institute for Basic Biology, specially-appointed professor
Mikio Nishimura

II. 成果の概要 (総括研究報告)

HBV の POL タンパク質は、これまでに多数の研究者が哺乳類や昆虫の培養細胞、大腸菌を始めとした微生物発現系を用いた合成系の確立を試みているものの、宿主細胞に対する非常に強い毒性のため、いまだ活性を保持した全長 POL タンパク質の合成は困難な状態にあった。この問題を解決するため、本課題では、in house ヒト無細胞タンパク発現系を開発し、酵素活性を維持した全長 POL の取得に成功した。それに続く、技術開発と POL 機能解析を進めた。

「POL 活性の分子生理学的解析」(杉山、西村)

オリジナルな in house ヒト無細胞系によるタンパク発現系を開発し、POL 活性の分子生理学的解析のために、HBV-POL 発現系を構築した。その結果、これまで困難であった全長 HBV-POL の合成と逆転写活性を確認し、活性のある HBV-POL の合成に成功した。

「POL 大量発現精製」(西村)

POL の安価な大量発現を実現するために、これまで困難であった大腸菌を用いた全長 HBV-POL 発現のための発現ベクターを構築した。この発現ベクターを用いて大腸菌の多数の系統から、大量のスクリーニングを実施した。大腸菌の大部分は、POL を発現できない又は増殖できなかったが、POL を発現しつつ生存可能である株を取得した。タンパク抽出には、一般的なタンパク質と比較して、特殊な条件であることがわかり、抽出バッファの組成を検証し、当初よりも精製度の高いタンパク質を得るためのバッファを開発した。

「POL 合成と活性条件の最適化」(杉山、西村)

ヒト無細胞系および大腸菌における HBV-POL 合成を最適化させるためのプロモーター配列、非翻訳配列および、タンパク質のタグの種類と位置を検証した。プロモーター、非翻訳配列を最適化し、発現量の大幅増大に成功した。また、POL 活性に影響を与えずにタンパク質合成・精製を行うためのタンパク質タグの種類と分子内の位置を決定した。

「HBV-POL とその他の HBV 遺伝子との相互作用解析」(杉山)

HBV-POL タンパクとその他の HBV タンパクの相互作用が、POL 活性に与える影響を検討した。各 HBV タンパクと共発現したところ、特定の組み合わせで逆転写活性が、POL 単独と比較して、約 3 倍に増加した。このことから、共存状態での生理学的変化 (pH、イオン濃度等) もしくは構造上の最適化が生じている可能性が推察された。

「POL と相互作用する宿主因子の解析」(西村)

POL 酵素活性に関連する宿主因子の解析を進めるために、ヒト無細胞系を駆使して、繰り返し発現実験を行うことで、タンパク量を確保した。それらを使って、現在、POL と結合しているタンパク質の網羅的解析を進めている。

「POL の発現と精製 (結晶構造解析と抗体作成に向けて)」(溝上)

in house ヒト無細胞系で POL を大量発現させ、それらの精製を繰り返し実施した。目標のタンパク量を得るためには、次年度の初期まで繰り返し行う必要がある。量がそろったところで、

結晶構造解析を進める。POL 抗体の作成については、必要な抗原量を確保できたことから、マウスに対して免疫する作業を進めた。

「HBV 遺伝子型間での POL 活性の比較」(杉山)

HBV 遺伝子型 (A-J 型) のそれぞれについて、複数のクローンを有しているため、それらを POL 発現系へサブクローニングし、最適化した系で POL 活性の比較を実施した。POL 発現量が遺伝子型ごとに異なり、さらに、遺伝子型によって逆転写活性が異なることが明らかとなった。今後は、遺伝子型ごとに POL 合成能が異なる原因と POL 活性の違いを生む責任部位の同定を進める。

The successful method for the protein expression of full-length HBV POL with the reverse transcription activity was not reported because HBV POL protein showed strong cell toxicity in some protein expression system such as E coli., human cell line, and insect cell. We have developed original protein expression system based on a modified human cell-free protein synthesis method. The cell-free system expressed full-length HBV POL protein showing reverse transcription, DNA synthesis, and the priming activity.

Then, we selected some E coli. clones from huge number of E coli. clone, which expressed active POL protein with stability. These E coli clones had an expression plasmid which promoter activity was strictly regulated by a specific chaperon. The protein expression in E coli showed a unique character on the extraction step. To overcome the problem, the optimized method to extract the full-length POL protein was developed by making new extraction buffer.

Next, the expression constructs of the cell-free system or E coli were modified to increase amount of the synthesis protein and to purify the protein easily. These constructions were applied for the cell-free and E coli system.

The protein-protein interaction upregulating POL activity was determined between HBV POL and the other HBV protein. In addition, host factors associated with POL activity was explored using the above cell-free system, which system contained the component of human cell.

We continued to prepare the abundant expression of POL to obtain the crystal structure of POL and the specific antibody against 3D structure of POL. Immunization against the full-length POL was prepared in mice. The titer of the antibody is observed continuously.

To compare the POL activity among HBV genotypes, POL gene was subcloned into our expression construct from HBV/A-J replication construct. The POL activity was different in each genotype. The responsible region of POL relating with different character of each genotype are determined ongoing.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 3 件）

1. Kanai M, Mano S, Nishimura M. An Efficient Method for the Isolation of Highly Purified RNA from Seeds for Use in Quantitative Transcriptome Analysis. *Journal of Visualized Experiments*. 2017, 119, e55008.
2. Kamigaki A, Nito K, Hikino K, Goto-Yamada S, Nishimura M, Nakagawa T, Mano S. Gateway Vectors for Simultaneous Detection of Multiple Protein-Protein Interactions in Plant Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation. *PLoS ONE*. 2016, 11(8), e0160717.
3. Adachi E, Sugiyama M, Shimizu S, Kodama K, Kikuchi T, Koga M, Mizokami M, Koibuchi T. Human immunodeficiency virus and hepatitis B genotype G/A2 recombinant co-infection: a case study. *Springerplus*. 2016 Sep 7;5(1):1502.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 真野昌二、西浜竜一、石田咲子、曳野和美、近藤真紀、西村幹夫、大和勝幸、河内孝之、中川強、ゼニゴケにおけるプロモータースワップ用 Gateway ベクター R4pMpGWB, およびプロモーター解析用 Gateway ベクターR4L1pMpGWB の開発, 第 58 回日本植物生理学会年会 (鹿児島大学) 2017/3/16~18 国内.
2. Masaya Sugiyama, Tatsuya Kanto, and Masashi Mizokami. Toll-like receptor 4 pathway mediate liver fibrosis in chimeric mice with human hepatocytes persistently infected with HBV. The international Liver Congress 2016 EASL. Barcelona, April 16th, Oral ePoster Booth1-4 国際
3. 杉山真也、考藤達哉、溝上雅史 TLR4 経路阻害による B 型肝炎ウイルス感染キメラマウスの肝線維化抑制効果の検討 ワークショップ WS4-8 第 52 回日本肝臓学会総会 ホテルニューオータニ幕張 2016 年 5 月 19 日 国内
4. Masaya Sugiyama, Tatsuya Kanto, and Masashi Mizokami TLR4 signaling mediates liver fibrosis in chimeric mice with humanized liver persistently infected with HBV 特別企画 JSH-EASL Joint Meeting SP1-2 第 52 回日本肝臓学会総会 ホテルニューオータニ幕張 2016 年 5 月 20 日 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. なし

(4) 特許出願

該当なし