

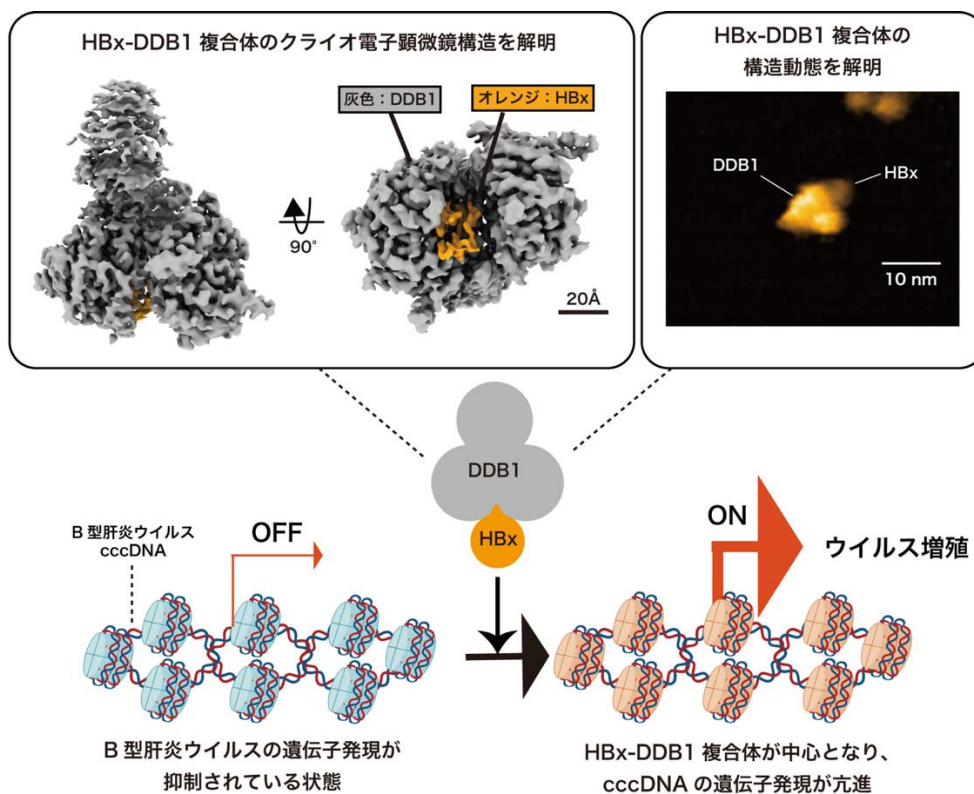
B型肝炎ウイルスの持続感染を支える ウイルス因子 HBx 複合体の立体構造を解明 —ウイルス遺伝子活性化の分子基盤を可視化—

【研究成果のポイント】

●B型肝炎ウイルスの持続感染を支える完全閉環二本鎖 DNA (cccDNA) からの転写を制御するウイルスタンパク質 HBx とヒト因子 DDB1 の複合体構造を、クライオ電子顕微鏡により初めて解明しました。

●高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) により、HBx が柔軟かつ球状の構造動態を示すことを可視化し、その動的性質が多様な宿主因子との結合を可能にし、ウイルスの持続感染に寄与していることが示唆されました。

●HBx が宿主タンパク質と協調的に相互作用する様子を可視化したことで、B型肝炎ウイルスが宿主の抑制的エピゲノム機構をいかに回避し、ウイルス遺伝子の発現を促進しているのかという根本的な問いへの理解が大きく進展しました。今後、本研究は B 型慢性肝炎に対する新たな治療戦略の基盤となることが期待されます。



【概要】

B型肝炎ウイルス（HBV）（注1）は、世界で約2億9千万人が持続感染しており、肝硬変や肝細胞がん（HCC）の主な要因となる深刻な公衆衛生問題となっています。特に、HBVの持続感染を担う covalently closed circular DNA（cccDNA）（注2）は、既存の治療法では完全には排除できず、根治治療の最大の障壁となっています。HBVが産生するXタンパク質（HBx）（注3）は、cccDNAからのウイルスRNA転写を促進する中心的な因子であり、その構造情報は、ウイルスの複製機構の理解や治療標的の探索において極めて重要となっています。しかし、HBxの立体構造はこれまで未解明でした。こうした背景のもと、国立健康危機管理研究機構（JIHS）国立国際医療研究所 ウイルス構造機能研究部の町田晋一テニュアトラック部長および田中大貴上級研究員は、北海道大学の前仲勝実教授、金沢大学ナノ生命科学研究所（WPI-NanoLSI）／新学術創成研究機構の柴田幹大教授、ナノ生命科学研究所（WPI-NanoLSI）炭竈享司特任助教（研究当時）、フランス国立科学センター（CNRS）のChristine Neuveut博士、熊本大学の三隅将吾教授、国立国際医療研究センター（※現：国立国府台医療センター）の溝上雅史プロジェクト長、愛媛大学の竹田浩之准教授らとの国際共同研究により、「B型肝炎ウイルスXタンパク質（HBx）複合体の構造基盤」を明らかにし、その成果を米国科学アカデミー発行の機関誌である「Proceedings of the National Academy of Sciences (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, PNAS)」に発表しました。

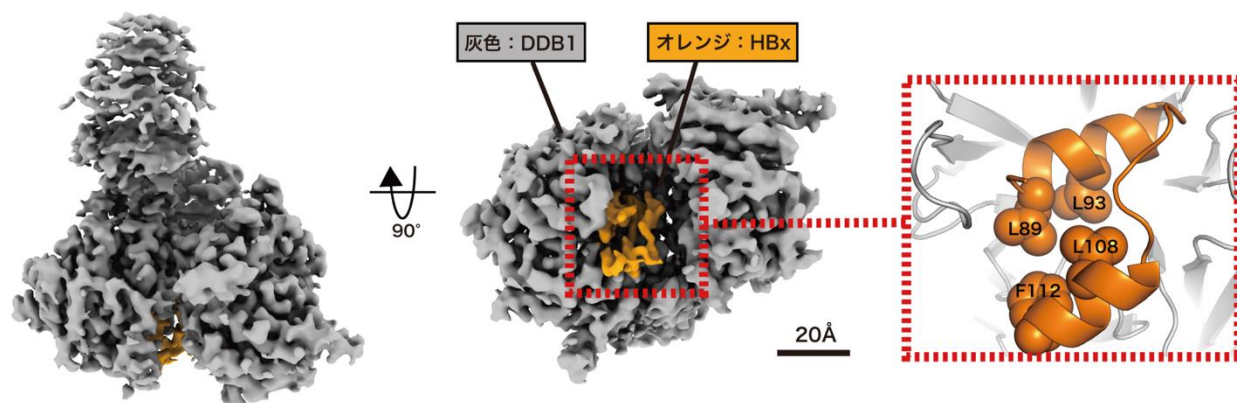
本研究では、B型肝炎ウイルスの持続感染に必要なHBx複合体を、クライオ電子顕微鏡および高速原子間力顕微鏡解析によって解析し、複合体の立体構造および分子動態を世界で初めて明らかにしました。

【研究の背景と成果】

B型肝炎ウイルス（HBV）は、世界で約2億9千万人が持続感染しており、肝硬変や肝細胞がん（HCC）の主な要因となる深刻な公衆衛生問題となっています。特に、HBVの持続感染を担う完全閉環二本鎖DNA（covalently closed circular DNA（cccDNA））は、既存の治療法では完全には排除できず、根治治療の最大の障壁となっています。

cccDNAはウイルスRNA産生の鋳型となり、HBV複製の中核を担っており、感染細胞からのcccDNAの除去、もしくは遺伝子発現の恒常的な抑制が、持続感染の根治につながると考えられています。特に、HBV由来のXタンパク質（HBx）は、cccDNAの安定性およびその遺伝子発現の亢進に重要な働きを担っており、HBxの構造機能に関する情報は、HBV複製機構の理解や新たな治療方法の探索において極めて重要です（図1）。しかし、全長のHBxは高い難溶性を示すため、その構造機能解析が大きく制限されていました。

このような背景のもと、国立健康危機管理研究機構（JIHS）国立国際医療研究所 ウイルス構造機能研究部の町田晋一テニュアトラック部長および田中大貴上級研究員らのグループは、全長HBxを、感染細胞内での主要な相互作用因子DDB1との複合体（HBx-DDB1複合体）としてヒト培養細胞にて高発現させ、大量かつ高純度に組換えタンパク質として調製することに成功しました。さらに、北海道大学の前仲勝実教授との共同研究にて、HBx-DDB1複合体をクライオ電子顕微鏡（注4）を用いて解析し、その複合体の三次元構造を解明しました（図1左、中）。その結果、HBxはV字構造を形成し、DDB1のポケット部分に結合することが明らかになりました。また、このV字構造内に形成される疎水性相互作用がHBV複製に必須であることが明らかになりました（図1右）。



B型肝炎ウイルス因子 HBx は V 字構造を形成し、DDB1 のポケット部分に結合する。

HBx 機能に重要な HBx 分子内疎水性相互作用

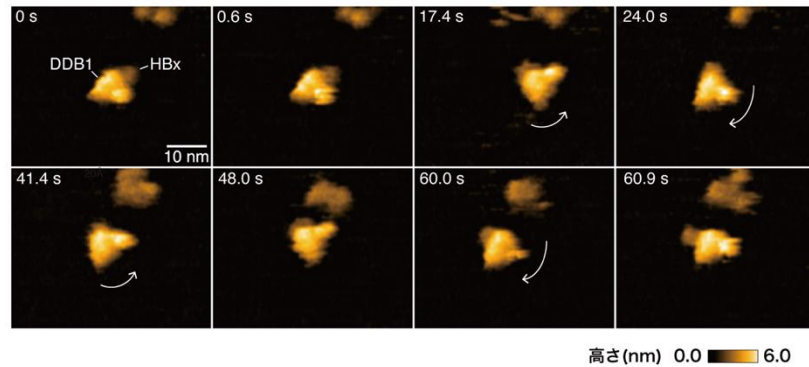
図 1 B型肝炎ウイルス因子 HBx とヒト因子 DDB1 のクライオ電子顕微鏡構造

(左、中)クライオ電子顕微鏡解析により明らかにした HBx-DDB1 複合体の密度。オレンジ色は HBx、灰色は DDB1 の密度。

HBx は V 字構造を形成し、DDB1 のポケットに結合している様子が観察された。

(右)HBx 分子内に形成された疎水性相互作用は、HBx の HBV 持続感染における機能に重要である。

一方で、HBx-DDB1 複合体のうち、DDB1 結合領域以外の HBx 部分については、クライオ電子顕微鏡では構造を捉えることができませんでした。そこで、金沢大学ナノ生命科学研究所 (WPI-NanoLSI) / 新学術創成研究機構の柴田幹大教授、ナノ生命科学研究所 (WPI-NanoLSI) の炭竈享司特任助教 (研究当時) との共同研究にて、HBx-DDB1 複合体全体の構造動態を高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) (注 5) により解析した結果、クライオ電子顕微鏡では可視化できなかった HBx の領域が、柔軟かつ球状の構造をとりながら動的に振る舞う様子が可視化されました (図 2)。このような動的構造特性により、HBx が多様な宿主因子と柔軟に相互作用できることが示唆され、ウイルスの持続感染維持に関与している可能性が示されました。実際に、生化学的解析により、HBx-DDB1 複合体が転写抑制複合体である SMC5/6 複合体の構成因子 NSE3 と直接結合し、その結果として SMC5/6 複合体の分解を誘導することで、cccDNA からの転写を活性化する分子機構が明らかとなりました。これにより、HBV が宿主の抑制的エピゲノム (注 6) 機構をいかに回避し、ウイルス遺伝子の発現を促進しているのかという根本的な問いへの理解が大きく進展しました (図 3)。また、HBx と DDB1 との相互作用を阻害する薬剤の開発は、B 型肝炎ウイルスの増殖の中核を担う cccDNA を標的とした新規治療法戦略として期待されます。今後、本研究成果は B 型慢性肝炎に対する新たな治療戦略の基盤となることが期待されます。



HBx は柔軟かつ球状の構造をとりながら動的に振る舞う

図2 B型肝炎ウイルス因子HBxとヒト因子DDB1の高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)イメージ

高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)により、HBx-DDB1複合体の構造動態を可視化した。クライオ電子顕微鏡では構造が捉えられなかったDDB1結合領域以外のHBx部分が、柔軟かつ球状の構造をとりながら動的に振る舞う様子が確認された。

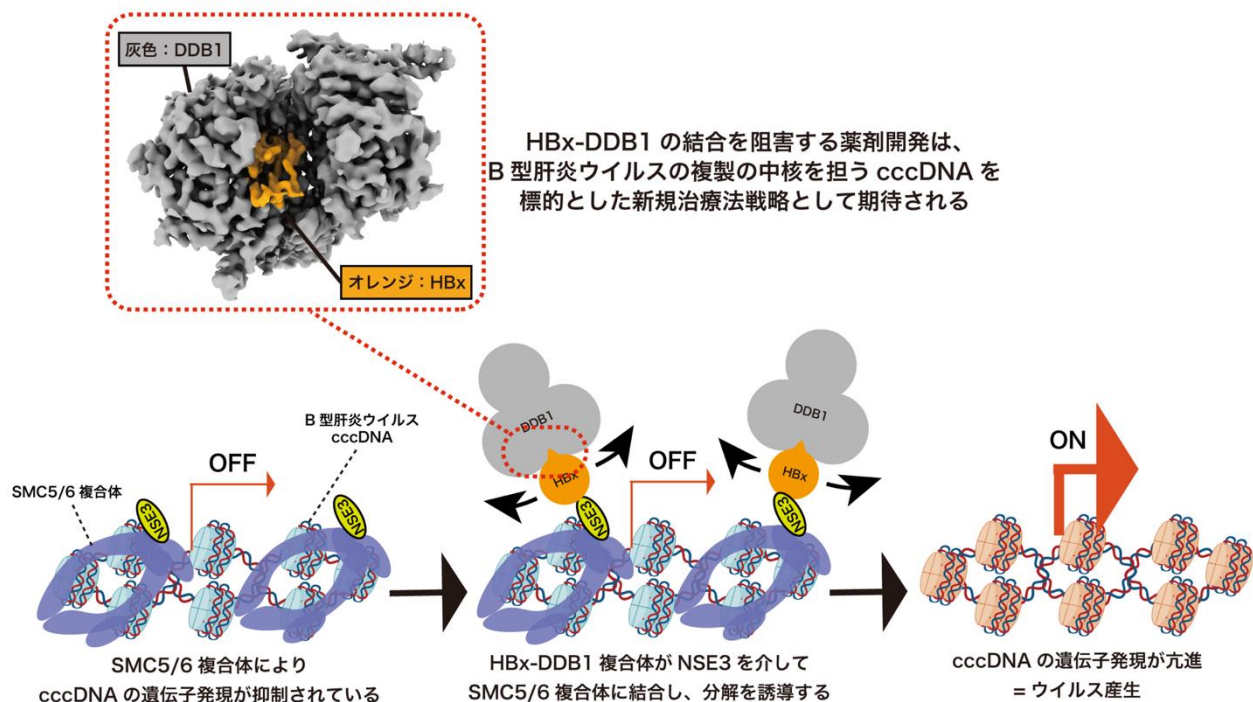


図3 HBx-DDB1複合体によるB型肝炎ウイルス遺伝子発現亢進のモデル

B型肝炎ウイルスの持続感染および遺伝子発現の亢進には、ウイルス因子HBxと宿主因子DDB1の複合体形成が中核的な役割を果たしている。このHBx-DDB1結合を阻害する薬剤は、ウイルス複製の鍵となるcccDNAの機能を抑制し、B型慢性肝炎の根治につながる新たな治療法となる可能性が期待される。

【発表者・研究者等情報】

国立健康危機管理研究機構

国立国際医療研究センター ウイルス構造機能研究部 テニユアトラック部長

熊本大学 大学院医学教育部 客員教授

町田 晋一

国立健康危機管理研究機構

国立国際医療研究センター ウイルス構造機能研究部 上級研究員

田中 大貴

北海道大学大学院薬学研究院 生体分子機能学研究室 教授

前仲 勝実

金沢大学 ナノ生命科学研究センター (WPI-NanoLSI) / 新学術創成研究機構 教授

柴田 幹大

【論文情報】

雑誌名 : Proceedings of the National Academy of Sciences (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, PNAS)

題 名 : Structural basis of the hepatitis B virus x protein in complex with DDB1

著者名 : Hiroki Tanaka, Joao Diogo Dias, Basile Jay, Shunsuke Kita, Mina Sasaki, Hiroyuki Takeda, Naoki Kishimoto, Shunsuke Sasaki, Shogo Misumi, Masashi Mizokami, Christine Neuveut, Takashi Sumikama, Mikihiro Shibata, Katsumi Maenaka and Shinichi Machida*

DOI: 10.1073/pnas.2421325122

URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.2421325122>

【研究助成】

本研究は以下の研究資金・枠組みによる支援のもと行われました。

- ・ 日本医療研究開発機構 (AMED) B型肝炎創薬実用化等研究事業等 (JP25fk0310547, JP25fk0310530, JP25fk0310527, JP25fk0410078, JP223fa627005, JP22ama121037, JP20ae0101047)
- ・ 文部科学省・日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費補助金 (JP25K02504, JP20H05873)
- ・ 国立国際医療研究センター国際医療研究開発費 (22T003, 23A1016, 23A1017)
- ・ 武田科学振興財団 医学系研究助成
- ・ 三菱財団 自然科学研究助成
- ・ 加藤記念財団 研究助成
- ・ 上原記念生命科学財団研究奨励金 研究助成
- ・ 持田記念医学薬学振興財団 研究助成
- ・ 文部科学省・世界トップレベル研究拠点プログラム (WPI) など

【用語解説】

注1 B型肝炎ウイルス（HBV）：急性または慢性の肝炎を引き起こすウイルス。感染が持続すると、肝硬変や肝がんへと進展する可能性があります。

注2 cccDNA：HBVに特有のゲノムDNAであり、ウイルス感染後に前駆体DNAをもとに細胞核内で形成されます。このcccDNAは、ウイルスゲノムRNAや各種ウイルスタンパク質をコードするmRNAの鋳型として機能します。一度形成されると細胞内に長期間残存するため、HBVの持続感染をもたらす要因となります。cccDNAが存在する限り、ワクチンや既存の抗ウイルス薬では完全な除去が難しく、B型肝炎の根治を阻む最大の障壁となっています。

注3 HBx：HBVがコードするウイルスタンパク質で、ウイルスの持続感染および肝発がんに深く関与することが知られています。特に、cccDNAの安定性およびその遺伝子発現の亢進に重要な働きを担っており、HBVの持続感染の根治療法開発の有効な標的と考えられています。

注4 クライオ電子顕微鏡：タンパク質などの試料を非結晶の水（アモルファスアイス）中に閉じ込め、極低温下で電子線を照射して高解像度の画像を取得する装置です。得られた画像をコンピュータによる画像処理技術により計算することで、試料の立体構造を原子レベルの精度で再構築することが可能です。

注5 高速原子間力顕微鏡（HS-AFM）：原試料表面の構造をナノスケールで観察するための装置です。カンチレバー（非常に細い探針）を用いて、タンパク質の分子表面の凹凸をなぞるように測定し、その構造や動態をリアルタイムで可視化・解析することが可能です。

注6 エピゲノムDNA塩基配列を変えずに、遺伝子の発現を調節する後天的な化学修飾などの総称です。代表的なものとして、DNAのメチル化やヒストン修飾などが知られています。HBV感染細胞の核内のcccDNAは、エピゲノムを保持することで、その遺伝子発現が調節されています。特に、HBxはcccDNAに形成された抑制的なエピゲノム状態を活性型に変化させることで、ウイルス遺伝子の発現を亢進し、ウイルス複製を促進します。

【問い合わせ先】

《研究に関すること》

国立健康危機管理研究機構 国立国際医療研究センター ウイルス構造機能研究部 テニユアトラック部長 町田 晋一

Tel：03-3202-7181 （代表）

《取材に関すること》

国立健康危機管理研究機構 危機管理・運営局 広報管理部

Tel：03-3202-7181 E-mail：press@jihs.go.jp

北海道大学社会共創部広報課

Tel：011-706-2610 E-mail：jp-press@general.hokudai.ac.jp

金沢大学ナノ生命科学研究センター事務室 広報・事業企画グループ

Tel：076-234-4555 E-mail：nanolsi-office@adm.kanazawa-u.ac.jp