

44. B型肝炎ウイルス細胞侵入複合体の形成機序と分子構造に関する研究

京都大学大学院医学研究科 准教授 野村 紀通

概要

C型肝炎がほぼ克服された一方で、B型肝炎ウイルス (HBV) の感染を原因としたB型肝炎は依然として世界の人々の健康を脅かしている。HBV感染の分子機構を解明し、感染抑制の方策を確立することにより、肝炎罹患の根本原因に歯止めをかけることが急務である。本研究では、(1) HBV感染の最初期にウイルスとヒト肝細胞表面でどのような相互作用が形成されるのか、(2) なぜHBVはヒトとチンパンジーにしか感染しないのか、という問題を構造生物学に立脚して明らかにすることを目的とした。

ヒト肝細胞表面のHBV感染受容体である膜蛋白質NTCPとHBVエンベロープ蛋白質のpreS1ドメインの複合体の構造を決定し、感染のトリガーとなるウイルス-宿主受容体間の相互作用の原子レベル解像度での可視化に成功した (Nature Structural and Molecular Biology, 2024)。また、HBVはヒトやチンパンジーには感染するが旧世界ザルやその他の哺乳動物に感染しない。カンクイザルNTCPの構造を精密解析し、感染受容体の微細な構造の差異によりHBV感染に厳密な種特異性が生じていることを明らかにした (Nature Communications, 2024)。今後これらの知見に基づいて、経口投与可能な抗HBV薬を開発することが次なる課題となる。

三菱財団様からの助成金は、研究推進に必要な試薬・資材の調達、電子顕微鏡画像データ解析用ワークステーションの拡充費用に使用させていただきました。ご支援を心より感謝いたしますとともに、厚く御礼申し上げます。

背景および目的

B型肝炎ウイルス (HBV) の感染は、世界の約2.9億人を苦しめる主要な公衆衛生問題である。HBV感染を原因とする慢性B型肝炎は肝硬変や肝細胞がんを引き起こし、年間約80万人が死亡している。しかしながら、慢性B型肝炎を完治する効果的な治療法は未だ確立されていない。HBV感染のメカニズムを解明し、感染抑制の方策を確立することにより、肝炎罹患の根本原因に歯止めをかけることが必要である。前研究において研究代表者らは、HBV感染受容体NTCPの構造を世界で初めて解明した (引用文献1、2)。その成果をさらに発展させて本研究では、(1) HBV感染の最初期にウイルスとヒト肝細胞表面でどのような相互作用が形成されるのか、(2) なぜHBVはヒトとチンパンジーにしか感染しないのか、という問題を構造生物学に立脚して明らかにすることを目標とした。

(1) HBVがヒト肝細胞表面の感染受容体に結合するメカニズムの解明

HBV感染の成立には、エンベロープタンパク質LHBs (large hepatitis B virus surface antigen)と、ヒト肝細胞表面にあり感染受容体として機能するナトリウム・タウロコール酸共輸送ポリペプチド (NTCP) との高親和性の結合が必須である。これまでのウイルス学研究から、LHBsのN末端の脂質修飾 (N-ミリスチル化) とそれに続くN末端側47残基のペプチド部分 (preS1) がNTCPとの結合において重要であることがわかっている。すなわち、

NTCP と preS1 との間に形成される相互作用は HBV 感染制御の観点から重要な創薬ターゲットであり、高精度可視化が長年待望されていた。

このような背景のもと、研究代表者らは NTCP-preS1 複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析に成功した (図 1)。preS1 は溶液中では特定の構造をもたない柔軟性に富むペプチド部分から成ると考えられていたが、NTCP と結合した状態では N 末端側約 20 残基部分がコンパクトに折り畳まれて NTCP 内部の中央キャビティに深く入り込むことが明らかになった。preS1 の N 末端に存在するミリスチル基 (脂質修飾) は NTCP の外側表面の脂質膜にアンカーされることも観察された。

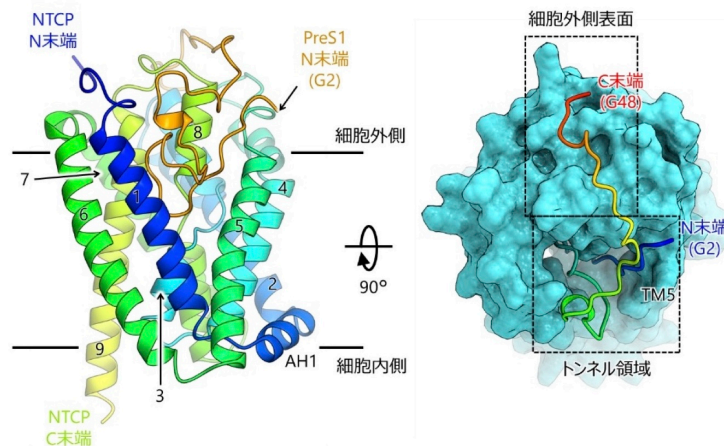


図 1. B 型肝炎ウイルス感染受容体 NTCP 相互作用.

B 型肝炎ウイルス (HBV) のエンベロープタンパク質 LHBs は肝細胞表面への付着に参与する。LHBs の N 末端部分である preS1 領域と受容体 NTCP の高親和性結合が HBV 感染成立に必須である。申請者らは NTCP-preS1 複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析に成功した。preS1 は溶液中では特定の構造をもたない柔軟性に富むペプチド部分から成ると考えられていたが、NTCP と結合した状態では N 末端側約 20 残基部分がコンパクトに折り畳まれて NTCP 内部の中央キャビティに深く入り込むことが明らかになった。preS1 の N 末端に存在するミリスチル基 (脂質修飾) は NTCP の外側表面の脂質膜にアンカーされることも観察された (Nature Struct. Mol. Biol., 2024)。

構造解析および胆汁酸輸送試験の結果、preS1 は NTCP の胆汁酸輸送経路を構成する中央キャビティを占有することで、胆汁酸の結合および輸送を競合的に阻害することが明らかになった。NTCP の preS1 結合部位と胆汁酸結合部位の多くは共通していたが、NTCP の細胞外側表面のループ領域や膜貫通ヘリックス TM8b の一部は preS1 との結合に関わるものの、胆汁酸の輸送経路には重ならないことが示唆された。したがって、これらの限定的な領域に特異的に結合する化合物を探索することにより、NTCP の胆汁酸輸送機能を維持しつつ、preS1 の結合のみを抑制できる次世代抗 HBV 薬の創出につながることを期待される。本研究成果は、構造情報に基づく合理的な抗ウイルス薬の分子設計に新たな道筋を拓くものである。

(2) HBV 感染の厳密な宿主特異性を規定する要因の解明

HBV は、ヒトやチンパンジーには感染するが、遺伝系統的に近いアカゲザルやカニクイザルなどの旧世界ザルには全く感染しない。カニクイザル NTCP(mNTCP)は、ヒト NTCP(hNTCP)と 96.0%の高いアミノ酸相同性を示すにも関わらず、受容体として機能しない。しかし、このわずかなアミノ酸配列の違いによって、mNTCP がなぜ HBV の受容体とならず、これらのサルに感染しないかは、解明されていなかった。本研究において研究代表者らは、クライオ電子顕微鏡構造、遺伝子変異導入、ウイルス感染、胆汁酸輸送、分子動力学(MD)シミュレーションなどを用いた各種解析を行い、mNTCP と hNTCP の構造を比較した結果、preS1 との結合において、NTCP 分子内の主に 2 つの部位が HBV 受容体として機能するかどうかを決定していることを解明した(図 2)。

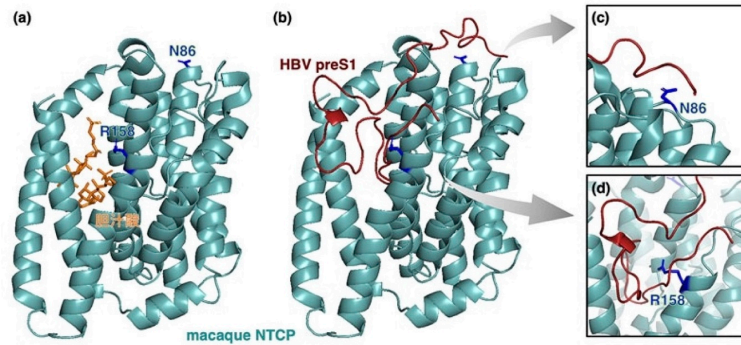


図 2. サルが B 型肝炎ウイルスに感染しない理由。

HBV – preS1 結合は mNTCP タンパク質の 2 つの領域によって妨害される。(a) mNTCP (シアン) -胆汁酸 (オレンジ) 複合体のクライオ電子顕微鏡構造。(b) mNTCP (シアン) と HBV preS1 (赤) (PDB: 8HRX) の仮想的重ね合わせ。(c) mNTCP の 86 番目アスパラギン (青) によって HBV preS1 結合は不安定となる。(d) mNTCP の 158 番目アルギニン (青) によって HBV preS1 の結合は妨害される。(Nature Communications, 2024)

1 つ目は、NTCP の胆汁酸トンネル入口に位置する 158 番目のアミノ酸が、hNTCP ではグリシン(G158)、mNTCP ではアルギニン(R158)である点である。側鎖がないグリシンによって胆汁酸トンネル入口が広い hNTCP には preS1 がぴったりはまり込むのに対し、アルギニンの大きな側鎖によって胆汁酸トンネル入口が狭い mNTCP には、アルギニン側鎖との衝突で preS1 がはまり込めないことが明らかになった。また、グリシン以外のすべてのアミノ酸ではアルギニンと同様、preS1 との結合を形成できないことも示された。158 番目のアミノ酸の位置は胆汁酸結合部位からは遠く、胆汁酸取り込み機能には関係しないこともわかり、この部位のアミノ酸変異は胆汁酸取り込み機能に変化なく、HBV 受容体機能を持異的に変換させることが示唆された。

2 つ目は、NTCP の細胞外表面に位置する 86 番目のアミノ酸が、hNTCP ではリシン(K86)、mNTCP ではアスパラギン(N86)である点である。hNTCP のリシンの長い側鎖は preS1 を NTCP 細胞外表面に強固につなぎ止め、安定な結合を形成するが、側鎖が比較的短いアスパラギンでは、preS1 の動的な揺らぎを抑える力が低く、preS1 結合が不安定になると考えられる。

以上の結果から、mNTCP では R158 が引き起こす立体障害と N86 での結合不安定性の二か所によって、preS1 結合による HBV 受容体機能を失っていることが明らかとなった。本研究の成果は、hNTCP と 96.0%ものアミノ酸が相同な mNTCP が HBV 受容体となり得ない理由を、受容体膜蛋白質の構造の特徴の違いから明らかにしたものである。これによって、なぜサルが HBV に感染しないかの本質が理解できた。サルは、胆汁酸輸送能力を損なうことなく HBV 感染を回避する機構を、進化の過程で獲得してきたと考えられる。本研究成果をさらに発展させることにより、HBV 感染メカニズムの全容解明や、ウイルスの動物間伝播のリスク評価法につながると期待される。

(完)

発表論文

- 1) Jinta Asami †, Jae-Hyun Park †, Yayoi Nomura †, Chisa Kobayashi †, Junki Mifune, Naito Ishimoto, Tomoko Uemura, Kehong Liu, Yumi Sato, Zhang Zhikuan, Masamichi Muramatsu, Takaji Wakita, David Drew, So Iwata, Toshiyuki Shimizu, Koichi Watashi*, Sam-Yong Park*, Norimichi Nomura*, Umeharu Ohto*
Structural basis of hepatitis B virus receptor binding
Nature Structural & Molecular Biology, 31:447-454, 2024

- 2) Kaho Shionoya † , Jae-Hyun Park † , Toru Ekimoto, Junko S. Takeuchi, Junki Mifune, Takeshi Morita, Naito Ishimoto, Haruka Umezawa, Kenichiro Yamamoto, Chisa Kobayashi, Atsuto Kusunoki, Norimichi Nomura, So Iwata, Masamichi Muramatsu, Jeremy R.H. Tame, Mitsunori Ikeguchi, Sam-Yong Park*, Koichi Watashi*
Structural basis for hepatitis B virus restriction by a viral receptor homologue
Nature Communications, 15: 9241, 2024

引用文献

- 1) Jinta Asami † , Kanako Terakado Kimura † , Yoko Fujita-Fujiharu † , Hanako Ishida, Zhikuan Zhang, Yayoi Nomura, Kehong Liu, Tomoko Uemura, Yumi Sato, Masatsugu Ono, Masaki Yamamoto, Takeshi Noda, Hideki Shigematsu, David Drew, So Iwata, Toshiyuki Shimizu, Norimichi Nomura*, Umeharu Ohto*
Structure of the bile acid transporter and HBV receptor NTCP
Nature, 606: 1021-1026, 2022
- 2) Jae-Hyun Park, Masashi Iwamoto, Ji-Hye Yun, Tomomi Uchikubo-Kamo, Donghwan Son, Zeyu Jin, Hisashi Yoshida, Mio Ohki, Naito Ishimoto, Kenji Mizutani, Mizuki Oshima, Masamichi Muramatsu, Takaji Wakita, Mikako Shirouzu, Kehong Liu, Tomoko Uemura, Norimichi Nomura, So Iwata, Koichi Watashi, Jeremy R. H. Tame, Tomohiro Nishizawa, Weontae Lee*, Sam-Yong Park*
Structural insights into the HBV receptor and bile acid transporter NTCP
Nature, 606: 1027-1031, 2022