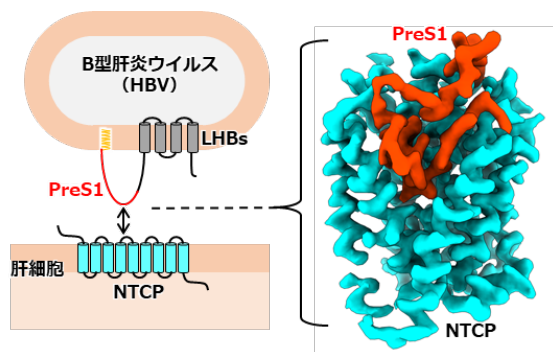


B型肝炎ウイルスが感染受容体に結合するしくみを解明

発表のポイント

- ◆B型肝炎ウイルスは肝細胞膜に存在する胆汁酸輸送体 NTCP を受容体として利用し、肝細胞に感染することが知られています。本研究では、B型肝炎ウイルスのエンベロープタンパク質 LHBs と NTCP の複合体のクライオ電子顕微鏡構造を解明しました。
- ◆構造解析、ウイルス感染試験、胆汁酸輸送試験により、LHBs の N 末端 preS1 ドメインが NTCP の胆汁酸輸送経路を形成する膜貫通トンネルを塞ぐように複雑に折りたたまれて結合することを明らかにし、この結合がウイルス感染に重要であることを見出しました。
- ◆NTCP を介した B型肝炎ウイルスの感染機構解明および B型肝炎に対する新規治療薬の合理的設計に役立つと期待されます。



B型肝炎ウイルスが感染受容体 NTCP を介して肝細胞に吸着するしくみ

概要

東京大学大学院薬学系研究科の浅見仁太 大学院生（研究当時）、清水敏之 教授、大戸梅治 准教授、横浜市立大学大学院生命医科学研究科の朴在鉉（パクジェヒョン） 研究員、石本直偉 大学院生、朴三用（パクサンヨン） 教授、京都大学大学院医学研究科の野村弥生 研究員、岩田想 教授、野村紀通 准教授、国立感染症研究所治療薬・ワクチン開発研究センターの小林ちさ 研究生（東京理科大学大学院創域理工学研究科 大学院生）、渡士幸一 治療薬開発総括研究官らの共同研究チームは、B型肝炎ウイルス感染初期にウイルスタンパク質が、肝細胞表面に存在する感染受容体である膜タンパク質 NTCP に結合する様子をクライオ電子顕微鏡分析により可視化しました。

本研究成果は 2024 年 1 月 17 日付（英国時間：17 日午前 10 時、日本時間：17 日 19 時）で Nature Structural & Molecular Biology ウェブサイトに掲載されました。

発表内容

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す。慢性 B型肝炎（注 1）は肝硬変や肝細胞がんを引き起こし、年間約 80 万人が死亡しています。しかし、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ません。LHBs は HBV のウイルス表面に発現する膜タンパク質であり、その N 末端に存在するミリスチル化 preS1 ドメインが肝細胞の基底膜に発現し門脈血流から肝細胞への胆汁酸（注 2）の取り込みを担う輸送

体膜タンパク質 Sodium-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) と直接結合することで、HBV の肝細胞への吸着およびその後の感染が進行すると考えられています(図 1)。PreS1 が結合した NTCP の立体構造はこれまで解明されておらず、HBV による肝細胞認識機構に関する構造学的知見は不十分でした。

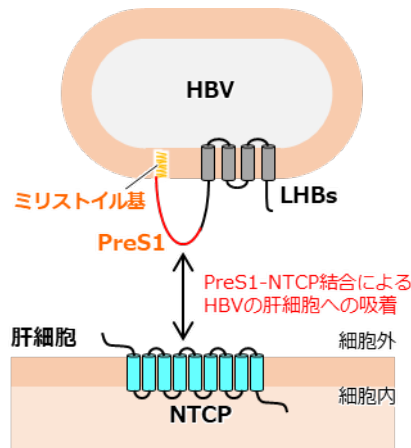


図 1 : PreS-NTCP 結合を介した HBV の肝細胞への吸着

本研究チームは、培養細胞で発現したヒト NTCP とミリストイル化 preS1 (2-48) ペプチドを混合し、NTCP-preS1 複合体を精製することに成功しました。得られた NTCP-preS1 複合体について、構造認識抗体 Fab (注 3) との複合体を調製し、東京大学のクライオ電子顕微鏡 (注 4) Titan Krios を用いて立体構造を解明しました。構造解析の結果、NTCP と preS1 は 1:1 の比率で結合し、preS1 が結合した NTCP は結合していない状態と類似した外開き構造をとっていました (図 2)。NTCP への preS1 の結合は広範な疎水性相互作用および水素結合により形成されていました。PreS1 (2-48) の N 末端側の約 30 残基は NTCP のトンネル領域にはまり込むように、一方 C 末端側の約 20 残基は細胞外側表面を這うように結合していました。PreS1 は特定の立体構造をとっていないと考えられていましたが、NTCP トンネル内部で複雑に折りたたまれており、既知のウイルス-受容体結合とは異なる誘導適合モデル (注 5) に従った結合様式をとることが明らかになりました。また、preS1 の N 末端には、ミリストイル基と思われる密度が NTCP の再構成された界面活性剤ミセル中に観測されました (図 3)。このことから、ミリストイル基は宿主細胞膜に繫留されることで、preS1 の結合を補強することが示唆されました。

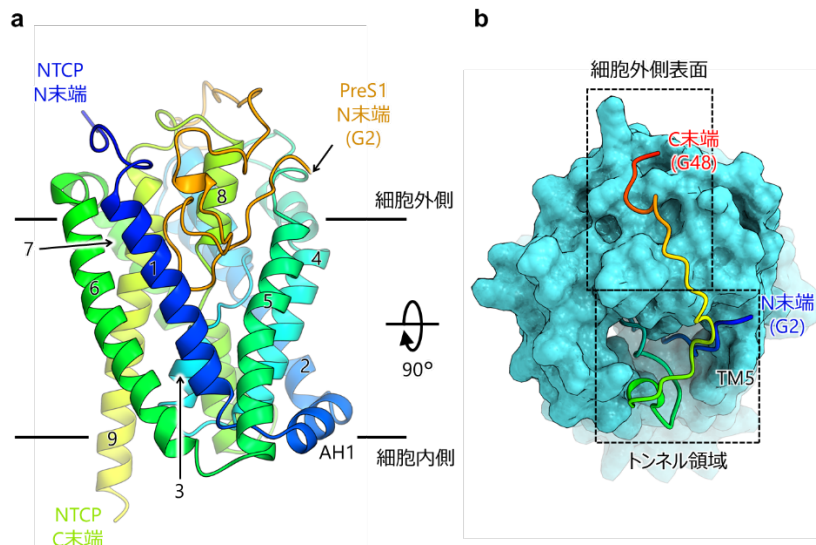


図 2 : ヒト NTCP-preS1 複合体のクライオ電子顕微鏡構造

- a. クライオ電子顕微鏡により決定された NTCP-preS1 複合体の立体構造。膜タンパク質である NTCP の細胞外側に preS1 ペプチド（オレンジ）が結合する様子が可視化された。NTCP は外開き構造をとっていた。
- b. NTCP-preS1 複合体の立体構造を細胞外側から見た図。NTCP は表面図、preS1 はカートゥーン図（N 末端（青）-C 末端（赤））で表示されている。PreS1 の N 末端側は NTCP のトンネル領域と主要な結合を形成し、C 末端側は細胞外側表面を這うように結合していた。

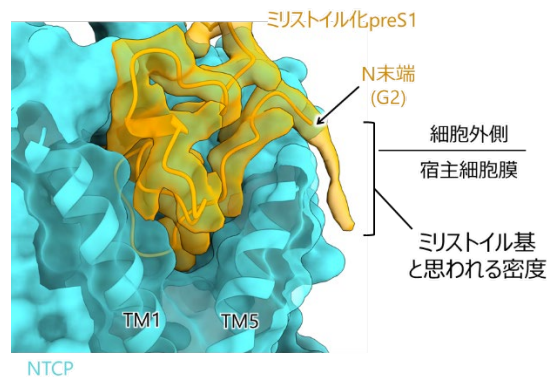


図 3 : PreS1 の N 末端ミristoil基の密度

PreS1 の N 末端に修飾されたミristoil基と思われる密度が観測された。この密度は NTCP 近傍のミセル中に観測された。

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トンネル領域を占有することで、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りました（図 4）。NTCP の preS1 結合部位と胆汁酸結合部位の多くは共通していましたが、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ました（図 5）。したがって、これらの領域を標的とした薬剤は、NTCP の胆汁酸輸送機能を維持しながら、preS1 の結合のみを抑制できる可能性があり、今後の開発が期待されます。

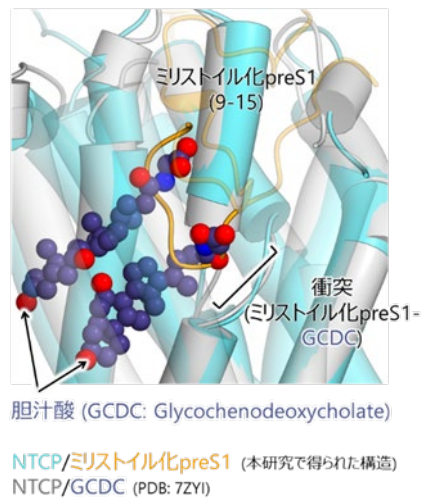


図 4 : ミリスチル化 PreS1 による基質輸送阻害

本研究で得られた NTCP-preS1 複合体の構造と既報の NTCP-胆汁酸複合体の構造 (PDB:7ZYI) の重ね合わせ。PreS1 は NTCP の胆汁酸輸送経路を構成するトンネル領域を占有していた。

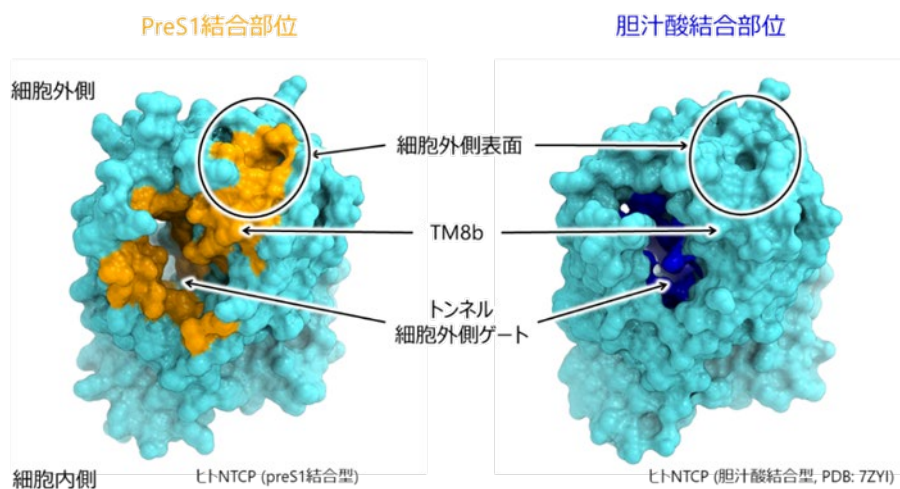


図 5 : PreS1 結合阻害薬の標的候補部位

NTCP に対する preS1 結合部位 (左) と胆汁酸結合部位 (右、PDB:7ZYI) の比較。両者の結合部位はトンネル細胞外側ゲートで重なるが、細胞外側表面領域や膜貫通ヘリックス TM8b の一部は preS1 との結合のみに関与することが示唆された。PreS1 結合のみに関わる領域は、副作用の少ない抗 HBV 薬の標的候補として有望である。

以上の結果より、HBV が外開き構造をとっている NTCP を標的とし、preS1 をトンネル領域と強固に結合させることで、ウイルス粒子を肝細胞膜に近接させるというモデルが考えられます (図 6)。

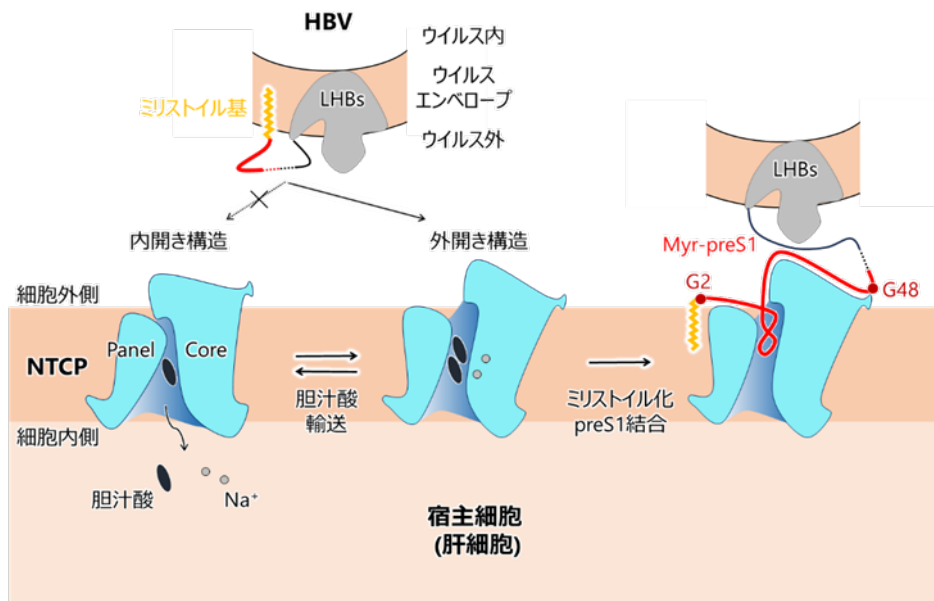


図 6 : HBV による宿主細胞認識モデル

HBV は外開き構造をとっている NTCP を標的とし、ミリスチル化 preS1 をトンネル領域と強固に結合させることで、ウイルス粒子を宿主細胞膜に近接させる。この際、エンベロープに挿入されているミリスチル基は宿主細胞膜へと転移し、preS1 の結合を補強すると考えられる。

本研究の成果は、HBV が肝細胞を認識するステップの詳細な構造基盤を提供するものです。また、今回明らかになった NTCP と preS1 の相互作用様式は他のウイルスでは報告のない誘導適合モデルに従うことから、ウイルスと宿主の多様な相互作用様式の一端を明らかにするものです。今後は、細胞表面に吸着した HBV がどのような分子機構で細胞内に侵入するのかについて、詳細に明らかにすることが求められます。

現在用いられている治療法では、慢性 B 型肝炎の患者に持続感染している HBV を身体から完全に排除することは難しく、新規メカニズムに基づく抗 HBV 薬の開発が求められます。NTCP への結合は HBV 感染成立に必須のステップであることから、このステップは HBV 感染を抑制する上で魅力的な創薬標的だと考えられます。本研究で HBV の preS1 と感染受容体 NTCP の詳細な相互作用が可視化されたことで、preS1 結合阻害薬を立体構造に基づいて合理的に設計することが期待されます。

○関連情報：

「プレスリリース①B 型肝炎ウイルス感染受容体であるヒト膜タンパク質の構造を解明」
(2022/5/18)

https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/press/z0111_90020.html

発表者・研究者等情報

東京大学大学院薬学系研究科

大戸 梅治 准教授
清水 敏之 教授
浅見 仁太 研究当時：博士課程

京都大学大学院医学研究科

野村 紀通 准教授
岩田 想 教授
野村 弥生 研究員

横浜市立大学大学院生命医科学研究科

朴 三用 (パク サンヨン) 教授
朴 在鉉 (パク ジェヒョン) 研究員
石本 直偉士 博士課程

国立感染症研究所治療薬・ワクチン開発研究センター

渡士 幸一 治療薬開発総括研究官
小林 ちさ 研究生 (東京理科大学大学院創域理工学研究科 大学院生)

論文情報

雑誌名 : Nature Structural & Molecular Biology

題名 : Structural basis of hepatitis B virus receptor binding

著者名 : 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[†]

(*共同筆頭著者, [†]共同責任著者)

DOI: 10.1038/s41594-023-01191-5

URL: <https://www.nature.com/articles/s41594-023-01191-5>

注意事項 (解禁情報)

日本時間 1 月 17 日 19 時 (英国時間 : 17 日午前 10 時) 以前の公表は禁じられています。

研究助成

本研究は、文部科学省 科学研究費補助金 (課題番号 19H00976、20H03499、19H05779、21H02449、18K05334、19H00923、22H02556、23H02724)、AMED 肝炎等克服実用化研究事業 (課題番号 JP22fk0310517、JP23fk0310504)、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) (課題番号 JP19am0101115 (支援番号 1570、1846、1848)、JP21am0101079) などの外部資金支援を受けて行われたものです。

用語解説

（注1）慢性 B 型肝炎

B型肝炎は、B型肝炎ウイルスが血液や体液等を介して感染して起きる肝臓の病気である。そのうち、6カ月以上持続している肝臓の炎症が慢性 B型肝炎である。慢性 B型肝炎患者の一部は肝硬変や肝細胞がんを発症する。

（注2）胆汁酸

肝臓でコレステロールから生合成されるステロイド化合物で、小腸からの脂肪の消化・吸収など脂質代謝に重要な役割を果たしている。回腸まで到達した胆汁酸の多くは腸管や肝臓に発現する胆汁酸トランスポーターの作用により再吸収され、腸肝循環を繰り返す。

（注3）Fab

抗体の重鎖の N 末端領域と軽鎖からなる断片。タンパク質の構造解析においては、標的タンパク質の構造安定性の向上や解析時の目印となることを目的として利用されることがある。

（注4）クライオ電子顕微鏡

液体窒素で冷却された超低温条件下でタンパク質などの生体分子に対して電子線を照射し、試料の観察を行うための装置。X線結晶構造解析法や NMR 法に並ぶタンパク質の立体構造解析手法の基盤技術として、近年急速な技術革新を遂げている。2017年には、その開発に貢献した研究者三名にノーベル化学賞が授与されている。

（注5）誘導適合モデル

タンパク質とそのリガンドを動的な存在と見なし、両者が相互作用しながら立体構造を変化させ、高親和性のタンパク質-リガンド複合体を形成するというモデル。