

Title	B型肝炎ウイルスの肝細胞特異的侵入機構の解明
Sub Title	Structural basis for the hepatocyte-specific entry of hepatitis B virus
Author	横川, 真梨子(Yokogawa, Mariko)
Publisher	福澤基金運営委員会
Publication year	2021
Jtitle	福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金事業報告集 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>B型肝炎ウイルス (HBV) は、肝細胞に侵入し肝炎を引き起こす。全世界には約2.4億人の慢性B型肝炎患者が存在し (WHO Fact sheet NO. 204)、慢性B型肝炎は肝癌や肝硬変などの重篤な疾患のリスクを高めるため、B型肝炎の克服は重要な課題である。HBVは、外殻タンパク質のpreS1領域が、肝細胞に特異的に発現した胆汁酸トランスポーター (NTCP) と結合することにより、肝細胞に侵入する。したがって、このpreS1とNTCPの相互作用は抗HBV薬の標的となりうる。そこで本研究は、preS1とNTCPの複合体構造を原子分解能で解明することにより、preS1とNTCPの相互作用の阻害を機序とする薬剤の創製に必要な立体構造情報を得ることを目指した。</p> <p>NTCPはこれまでに、大腸菌抽出液を用いた無細胞合成系で合成し、界面活性剤であるドデシルマルチド (DDM) で可溶化して精製することにより、SDS-PAGE上でCBB染色により単一バンドを検出することに成功していた。しかし、このように調製したNTCPでは、preS1結合活性を表面プラズモン共鳴法 (SPR) により検出することができなかった。そこで、無細胞タンパク質合成の反応液に脂質と界面活性剤を加え、透析しながら合成を行うことで、脂質二重膜中にNTCPを埋め込むことに成功した。沈殿画分として得たNTCPを含む膜成分に対して超音波破碎を行うことにより、遠心上清にNTCPリボソームを調製する方法を確立した。調製したNTCPリボソームのpreS1結合活性は、共沈降実験により確認した。現在、SPRまたは等温滴定型カロリメトリーによる結合親和性の定量的な解析、およびNMR法によるpreS1上のNTCP結合残基の同定を試みている。</p> <p>Chronic hepatitis B is a global health problem caused by the hepatitis B virus (HBV) infection, which leads to liver cancer and liver cirrhosis. HBV enters hepatocytes via NTCP, an HBV receptor specifically expressed in the cytoplasmic membrane of hepatocytes, where an N-terminal region referred to as preS1 of an HBV surface protein (L protein) directly binds to NTCP. Therefore, the preS1-NTCP interaction is a potential target for anti-HBV drugs. In this study, we aimed to determine the structure of preS1-NTCP complex at an atomic resolution, which is useful for structure-guided drug design of novel HBV entry inhibitors.</p> <p>We previously succeeded the NTCP expression using a cell-free protein synthesis system. NTCP was solubilized by n-dodecyl beta-D-maltoside (DDM) and purified as a single band on a CBB-stained SDS-PAGE gel. However, the purified NTCP exhibited no preS1-binding activity in a surface plasmon resonance (SPR) assay. To obtain active NTCP, we performed cell-free protein synthesis using a dialysis system including lipid and detergent within the reaction buffer, leading to the production of NTCP embedded in lipid bilayers. NTCP-containing liposomes were prepared by sonication, and the preS1-binding activity was confirmed by co-sedimentation assay.</p> <p>Further analyses of the interaction between NTCP-containing liposomes and preS1 are underway by SPR and isothermal titration calorimetry (ITC) to determine the binding affinity and stoichiometry, and NMR to identify the NTCP binding residues on preS1.</p>
Notes	申請種類 : 福澤基金研究補助
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO12003001-00002020-0026">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO12003001-00002020-0026</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	薬学部	職名	専任講師	補助額	1,500 千円
	氏名	横川 真梨子	氏名 (英語)	Mariko Yokogawa		
研究課題 (日本語)						
B型肝炎ウイルスの肝細胞特異的侵入機構の解明						
研究課題 (英訳)						
Structural basis for the hepatocyte-specific entry of hepatitis B virus						
研究組織						
氏名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
横川真梨子 (Mariko Yokogawa)		薬学部・薬科学科・専任講師				
大澤匡範 (Masanori Osawa)		薬学部・薬科学科・教授				
1. 研究成果実績の概要						
<p>B型肝炎ウイルス(HBV)は、肝細胞に侵入し肝炎を引き起こす。全世界には約2.4億人の慢性B型肝炎患者が存在し(WHO Fact sheet NO. 204)、慢性B型肝炎は肝臓や肝硬変などの重篤な疾患のリスクを高めるため、B型肝炎の克服は重要な課題である。HBVは、外殻タンパク質のpreS1領域が、肝細胞に特異的に発現した胆汁酸トランスポーター(NTCP)と結合することにより、肝細胞に侵入する。したがって、このpreS1とNTCPの相互作用は抗HBV薬の標的となりうる。そこで本研究は、preS1とNTCPの複合体構造を原子分解能で解明することにより、preS1とNTCPの相互作用の阻害を機序とする薬剤の創製に必要な立体構造情報を得ることを目指した。</p> <p>NTCPはこれまでに、大腸菌抽出液を用いた無細胞合成系で合成し、界面活性剤であるドデシルマルトシド(DDM)で可溶化して精製することにより、SDS-PAGE上でCBB染色により単一バンドを検出することに成功していた。しかし、このように調製したNTCPでは、preS1結合活性を表面プラズモン共鳴法(SPR)により検出することができなかった。そこで、無細胞タンパク質合成の反応液に脂質と界面活性剤を加え、透析しながら合成を行うことで、脂質二重膜中にNTCPを埋め込むことに成功した。沈殿画分として得たNTCPを含む膜成分に対して超音波破碎を行うことにより、遠心上清にNTCPリポソームを調製する方法を確立した。調製したNTCPリポソームのpreS1結合活性は、共沈降実験により確認した。現在、SPRまたは等温滴定型カロリメトリーによる結合親和性の定量的な解析、およびNMR法によるpreS1上のNTCP結合残基の同定を試みている。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>Chronic hepatitis B is a global health problem caused by the hepatitis B virus (HBV) infection, which leads to liver cancer and liver cirrhosis. HBV enters hepatocytes via NTCP, an HBV receptor specifically expressed in the cytoplasmic membrane of hepatocytes, where an N-terminal region referred to as preS1 of an HBV surface protein (L protein) directly binds to NTCP. Therefore, the preS1-NTCP interaction is a potential target for anti-HBV drugs. In this study, we aimed to determine the structure of preS1-NTCP complex at an atomic resolution, which is useful for structure-guided drug design of novel HBV entry inhibitors.</p> <p>We previously succeeded the NTCP expression using a cell-free protein synthesis system. NTCP was solubilized by n-dodecyl beta-D-maltoside (DDM) and purified as a single band on a CBB-stained SDS-PAGE gel. However, the purified NTCP exhibited no preS1-binding activity in a surface plasmon resonance (SPR) assay. To obtain active NTCP, we performed cell-free protein synthesis using a dialysis system including lipid and detergent within the reaction buffer, leading to the production of NTCP embedded in lipid bilayers. NTCP-containing liposomes were prepared by sonication, and the preS1-binding activity was confirmed by co-sedimentation assay. Further analyses of the interaction between NTCP-containing liposomes and preS1 are underway by SPR and isothermal titration calorimetry (ITC) to determine the binding affinity and stoichiometry, and NMR to identify the NTCP binding residues on preS1.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			