

原子間力顕微鏡を用いたウイルス感染機構の力学的評価

神戸大学 大学院科学技術イノベーション研究科

西村 勇哉

1. 背景と目的

B型肝炎ウイルスの感染機構は長年研究されており、ウイルス側の細胞認識部位は特定されている。B型肝炎ウイルスの表面抗原Lタンパク質はPreS1領域・PreS2領域・S領域の3つのドメインから構成されており、PreS1領域に含まれる21-47アミノ酸残基が肝細胞と結合しているとされている。しかしながら、肝細胞側の受容体は特定されていない。

これまでの研究で、レクチンのインターロイキン6 (IL-6) やリポタンパクリパーゼ (LPL) がPreS1(21-47)領域と結合することが確認され、これらのタンパク質を介して肝細胞表面上のヘパラン硫酸などのプロテオグリカンに結合することが報告されている。また、B型肝炎ウイルスはPreS1(21-47)領域を介してではないが、免疫グロブリンA受容体、アジア糖タンパク受容体、トランスフェリン受容体、アポリポタンパク質H、重合血清アルブミン、フィブロネクチンなどと相互作用することも報告されている。

このように感染経路の候補が挙がっているものの、特定はされていないのが現状である。そこで本研究では、相互作用と細胞内へ取り込み機構を力学的に解明するためのツールとして原子間力顕微鏡 (AFM) を使用し、B型肝炎ウイルスが肝細胞を認識して結合する機構を力学的に評価することを目的とした。

2. 結果及び考察

① B型肝炎ウイルスの表面抗原PreS1-PreS2と肝細胞の相互作用

まず、AFMによってPreS1-PreS2ペプチドと肝細胞の相互作用を検出可能か確認するために、*E. coli*から産生した緑色蛍光タンパク質 (GFP) 融合PreS1-PreS2タンパク質 (PreS1S2GFP) をカンチレバーに修飾し、カルボキシメチルセルロースに固定化した肝がん細胞 (HepG2) との力学的相互作用を検出した (Fig. 1)。その結果、GFPをカンチレバーに修飾した場合と比較して、PreS1S2GFPはHepG2との結合を示した。これにより、PreS1S2が肝細胞と結合し、その結合力をAFMで検出可能なことが確認された。

次にPreS1-PreS2と肝細胞の結合が細胞特異的であることを確認した。カンチレバーに修飾したPreS1S2GFPを肝がん細胞 (HepG2) と膵臓腺がん細胞 (BxPC-3) と接触させた (Fig. 2)。その結果、BxPC-3よりもHepG2の

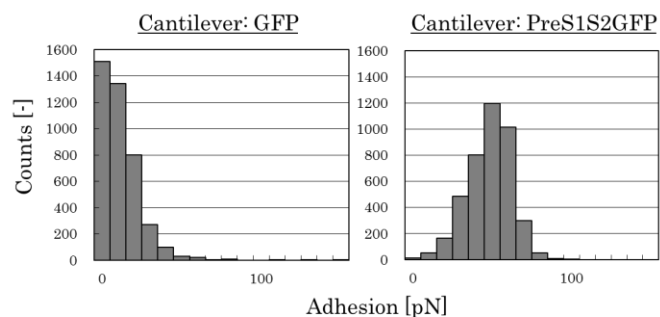


Fig.1 肝がん細胞HepG2との相互作用の検出

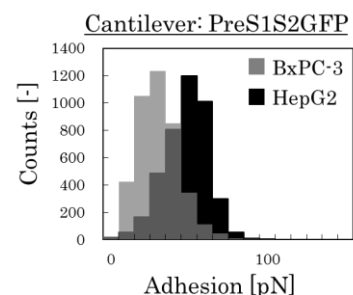


Fig.2 標的細胞 (HepG2) と非標的細胞 (BxPC-3) の比較

場合により大きな相互作用が検出された。これにより、PreS1-PreS2が細胞特異的に結合することを力学的に検出できた。また、細胞表面上の結合部分を結合力によってマッピングすることにも成功した (Fig. 3)。

これらの結果から、PreS1-PreS2をカンチレバーに修飾することで、肝細胞との相互作用を力学的に評価する系を確立することができた。そのため、以下ではこの系を利用して感染機構の特定を目指した。

②IL-6を介した感染機構の検証

まず、IL-6が感染機構に関与しているかを確認するため、カンチレバーにIL-6を修飾してHepG2との相互作用を測定した。その結果、IL-6とHepG2では力学的な相互作用は検出されなかった (data not shown)。しかしながら、IL-6がHepG2の細胞表面上にすでに結合している可能性があるため、HepG2細胞表面上にIL-6が存在するかをフローサイトメーターで確認した (Fig. 4)。IL-6の添加/無添加にかかわらず、蛍光標識したanti-IL-6抗体による細胞表面上のIL-6検出量には変化がなかった。つまり、IL-6が元々肝細胞表面に存在していることが確認された。

そこで、報告されているIL-6とPreS1の相互作用を実際に力学的に評価した。金盤表面にIL-6を固定化し、カンチレバーにPreS1S2GFPを修飾して相互作用を測定した。その結果、IL-6の有無で変化はなく、IL-6とPreS1の相互作用は検出されなかった (data not shown)。つまり、IL-6を介したB型肝炎ウイルスの肝細胞への感染機構は可能性が低いことが証明された。

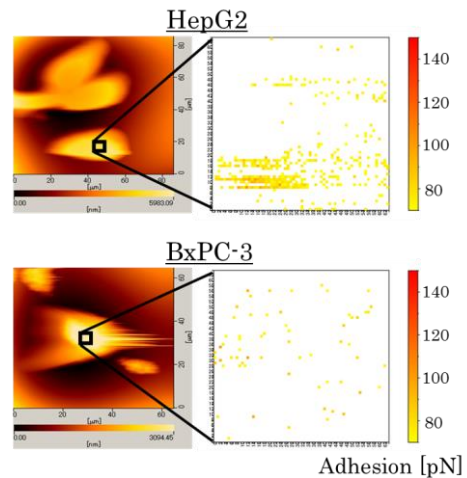


Fig.3 細胞表面の相互作用マッピング

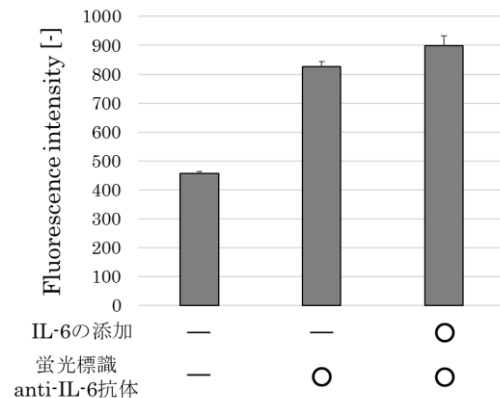


Fig.4 HepG2細胞表面に存在するIL-6検出

3. まとめと課題

本研究では、B型肝炎ウイルスが肝細胞を認識して結合する感染機構をAFMによって力学的に評価することを目指した。その結果、B型肝炎ウイルスの表面抗原PreS1-PreS2をカンチレバーに修飾して細胞との相互作用を測定することで、細胞特異性と結合力を確認することができた。そして、感染機構の候補のひとつであるIL-6を介した結合が力学的な評価によって感染機構に関与しないことが示唆された。

今後の課題は、感染機構の他の候補 (LPL、ミリスチル基) の検証である。また、細胞表面のマッピングで相互作用が確認されたレセプターを特定し、そのレセプターとの結合を力学的に評価する一連の手法を確立することである。