



Title	Generation of Replication-Competent Hepatitis B Virus Harboring Tagged Polymerase for Visualization and Quantification of the Infection
Author(s)	森田, 千晴
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101781
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	森田 千晴
論文題名 Title	Generation of Replication-Competent Hepatitis B Virus Harboring Tagged Polymerase for Visualization and Quantification of the Infection (タグ化ポリメラーゼをもつB型肝炎ウイルス作製による、感染の可視化及び定量化の試み)
論文内容の要旨(Abstract of Thesis)	
〔目 的(Objective)〕 B型肝炎ウイルス（HBV）は世界で約3億人の慢性感染者を抱えており、急性もしくは慢性肝炎を引き起こす。B型肝炎から肝硬変、肝臓に病態が進行することがあり、そのようなHBV関連疾患で年間約90万人もの死者がいる。現在の治療法では効果の個人差や持続投与の必要性といった課題があり、新規治療法の開発が急がれるが、HBVの細胞内動態も未だ不明な点が多く研究開発が進んでいない。HBVはその複製過程で重要な逆転写をになうタンパク質としてHBVポリメラーゼ(HBVpol, pol)を有しており、HBVpolは重要な治療標的である。しかしながらHBVpolはその発現や精製が困難であることも相まって、詳細な機能や細胞内動態は未だ不明な点が多い。この問題を解決し、HBV感染細胞内でHBVpol発現の追跡を可能とするツールの作製を試みた。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 HBVpol内部のHBVpolの機能を担わないとされるスパーサー領域にPAタグもしくはHiBiTタグを導入し、PAタグ化HBVpol (pol-PA)もしくはHiBiTタグ化HBVpol (pol-HiBiT)を構築した。このとき、スパーサー領域と重複するPreS1-ORFとタグ配列が重ならないよう調整した。このpol-PAとpol-HiBiTをHEK293T細胞HepG2-NTCP (NTCP/G2)細胞に発現させ、pol-PA及びpol-HiBiTをwestern blotting もしくはimmunofluorescence assay (IFA)で検出した。また、HBVpol欠損HBV複製ベクターとそれぞれのHBVpolを発現したNTCP/G2細胞では、合成された細胞内HBV DNAが検出され、pol-PAとpol-HiBiTが逆転写酵素活性を維持していることを確認した。 続いて、このpol-PAもしくはpol-HiBiTをHBVゲノムに導入し、1.2倍長のそのHBVゲノムを持つHBV複製プラスミド(pHBV pol-PA/ pHBV pol-HiBiT)を構築した。それぞれをNTCP/G2に発現させると、HBsAg・細胞内HBV DNA・HBsAgは、pHBV pol-WT発現時と比較して有意差なく検出された。一方で、細胞外LSタンパク質の発現量は有意に低下しており、Northern blottingの結果、特にPAタグ挿入により2.4 kbのmRNAの発現が著明に低下していた。よってPAタグの挿入が2.4 kb mRNA転写に影響したと示唆された。さらに、pHBV pol-PAを発現させたNTCP/G2細胞においてIFAを行なうと、HBV複製細胞内でpol-PAとcapsidの共局在が確認され、またpHBV pol-HiBiTを発現させたNTCP/G2細胞でHiBiT Assayを行なうと、pol-HiBiT発現に由来する有意な発光量の増加が認められたことより、HBV複製細胞においてHBVpolの発現量を視覚的・定量的に検出できることが示唆された。 またこれらのHBV複製細胞から産生したHBV粒子を塩化セシウム密度勾配遠心法で性状解析したところ、pHBV pol-WTもしくはpHBV pol-HiBiTから産生した粒子は密度1.15-1.2 g/mlの分画に分離された。一方で、pHBV pol-PAからはLSタンパク質発現がなく、HBV粒子を分離できなかった。そのため、LS発現ベクターとpHBV pol-PAと共発現させてLSタンパク質発現を補ったところ、HBV粒子が密度1.15-1.2 g/mlの分画に分離された。続いて産生した粒子を、0, 100, 500, 1000 GEI(genome equivariant of infection) でヒト初代肝細胞に感染させたところ、経時的かつ感染量依存的な細胞外HBsAgの上昇が検出された。また、感染量依存的に細胞内HBV DNAは増加し、これは逆転写阻害剤であるエンテカビル投与によって有意に低下した。以上のことより、それぞれのpHBVから産生した粒子は感染性を持っている成熟HBV粒子であると確認された。	
〔総 括(Conclusion)〕 タグ化HBVpolをもつ感染及び複製可能な組換えHBV粒子を構築した。この粒子はHBV複製細胞・HBV感染細胞でHBVpolの発現の可視化及び定量化を可能とするツールとして、抗HBV薬のスクリーニングやHBVpolの発現動態解明に使用でき、抗HBV戦略への貢献が期待される。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		森田 千晴	
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	上田 裕次 署名
	副 査	大阪大学教授	小林 剛 署名
	副 査	大阪大学教授	塩田 達也 署名

論文審査の結果の要旨

B型肝炎ウイルス(hepatitis B virus; HBV)は、HBVはゲノム構造の特性、遺伝子配置の複雑さから、外来性遺伝子をゲノムに導入することが困難で、アイデアを駆使した高度な研究が求められる。そして、HBVの感染・増殖動態に関して今尚不明な点が多い。

本論文では逆転写を経由したゲノム複製に関わるHBVポリメラーゼ(HBVpol)に着目し、HBVpolのspacer領域に短いタグ（PAタグ/HiBiTタグ）を挿入することで、機能を維持し検出可能なタグ化HBVpolを構築できることを証明した。またタグ化HBVpolをHBV発現ベクターに組換え、これらのベクター(pHBV pol-PA/pol-HiBiT)を肝癌細胞株に遺伝子導入することによって、細胞内でHBV複製が起こることを示した。また、HBV複製細胞内でこれらのタグ化HBVpol発現が、免疫蛍光染色及びルシフェラーゼ発光測定によって、可視化及び定量化が可能であることが示唆された。またこのHBV複製細胞から成熟したHBV粒子が産生され、それらの粒子が感染性を持つことが示された。

本研究は、細胞内動態の解明と新規抗HBV薬探索に大いに貢献するものであり、博士（医学）の学位授与に値する。